

**BEST AVAILABLE COPY**

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**



International Patent Application of

KANDA, et al.

Atty. Ref.: 249-202

Serial No. 09/971,773

Group: 1632

Filed: October 9, 2001

Examiner: Kelly, Robert

For: ANTIBODY COMPOSITION-PRODUCING CELL

\* \* \* \* \*

August 12, 2004

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

**SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENTS**

It is respectfully requested that this application be given the benefit of the foreign filing date under the provisions of 35 U.S.C. §119 of the following, a certified copy of which is submitted herewith:

<u>Application No.</u>	<u>Country of Origin</u>	<u>Filed</u>
2000-308526	Japan	6 October 2000
PCT/JP01/08804	Japan	5 October 2001

Respectfully submitted,

**NIXON & VANDERHYE P.C.**

By: \_\_\_\_\_

B. J. Sadoff  
Reg. No. 36,663

BJS:pp  
1100 North Glebe Road, 8th Floor  
Arlington, VA 22201-4714  
Telephone: (703) 816-4000  
Facsimile: (703) 816-4100

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2000年10月6日  
Date of Application:

出願番号 特願2000-308526  
Application Number:

[ST. 10/C]: [JP 2000-308526]

出願人 協和醗酵工業株式会社  
Applicant(s):

2004年6月17日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

出証番号 出証特2004-3052310

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-35845

【提出日】 平成12年10月 6日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 5/00

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会  
社 東京研究所内

【氏名】 神田 豊

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会  
社 東京研究所内

【氏名】 佐藤 光男

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会  
社 東京研究所内

【氏名】 中村 和靖

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会  
社 東京研究所内

【氏名】 内田 和久

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会  
社 東京研究所内

【氏名】 新川 豊英

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会  
社 東京研究所内

【氏名】 山根 尚子

## 【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会  
社 東京研究所内

【氏名】 山▲崎▼ 基生

## 【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会  
社 東京研究所内

【氏名】 花井 陳雄

## 【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100105647

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 小栗 昌平

【電話番号】 03-5561-3990

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100105474

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 本多 弘徳

【電話番号】 03-5561-3990

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100108589

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 市川 利光

【電話番号】 03-5561-3990



## 【選任した代理人】

【識別番号】 100115107

【弁理士】

【氏名又は名称】 高松 猛

【電話番号】 03-5561-3990

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100090343

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗宇 百合子

【電話番号】 03-5561-3990

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 092740

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 糖タンパク質生産細胞

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が人為的手法により低下した細胞。

【請求項 2】 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素が、糖タンパク質の糖鎖還元末端の修飾に係わる酵素である、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 3】 糖タンパク質の糖鎖還元末端の修飾に係わる酵素の活性が人為的手法により制御された細胞。

【請求項 4】 糖タンパク質の糖鎖還元末端の修飾に係わる酵素の活性が人為的手法により増大した細胞。

【請求項 5】 人為的手法が、以下の (a)、(b)、(c)、(d) 及び (e) からなる群から選ばれる手法である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の細胞。

(a) 前記酵素の活性の阻害剤又は活性化剤を培地に添加する手法；

(b) 前記酵素についての突然変異体を選択する手法；

(c) 前記酵素の遺伝子を導入する手法；

(d) 前記酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；

(e) 前記酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法。

【請求項 6】 突然変異体を選択する手法が、自然発生的に生じた突然変異体又は親株を突然変異誘発処理することで生じた突然変異体を、前記酵素の活性又は糖タンパク質の糖鎖の構造を指標に所望の突然変異体を選択する手法である、請求項 5 に記載の細胞。

【請求項 7】 糖タンパク質の糖鎖の構造を指標に所望の突然変異体を選択する手法が、N-グリコシル結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンへの糖の付加の有無を指標に所望の突然変異体を選択する手法である、請求項 6 に記載の細胞。

【請求項 8】 付加する糖がフコースである、請求項 7 に記載の細胞。

【請求項 9】 遺伝子破壊の手法が、アンチセンス法、リボザイム法、相同組

換え法、RDO法、RNAi法又はトランスポゾンを用いた遺伝子破壊の手法である、請求項5に記載の細胞。

【請求項10】 前記酵素が糖転移酵素である、請求項1～9のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項11】 糖転移酵素が、その活性の低下により該酵素を含む細胞の増殖に影響を及ぼさない糖転移酵素である、請求項10に記載の細胞。

【請求項12】 糖転移酵素が、その活性の増大により該酵素を含む細胞の増殖に影響を及ぼさない糖転移酵素である、請求項10に記載の細胞。

【請求項13】 糖転移酵素が、N-グリコシル結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖を付加する活性を有する酵素である、請求項10～12のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項14】 付加する糖がフコースである、請求項13に記載の細胞。

【請求項15】 糖転移酵素がフコシルトランスフェラーゼである、請求項10～14のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項16】 糖転移酵素が、 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼである、請求項10～15のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項17】 以下の(a)、(b)、(c)及び(d)からなる群から選ばれるDNAが導入されて該DNA分子がコードするタンパク質の活性が増加した細胞：

(a) 配列番号1で表される塩基配列を有するDNA；

(b) 配列番号2で表される塩基配列を有するDNA；

(c) 配列番号1で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号1で表される塩基配列を有するDNAがコードするタンパク質の活性を有するタンパク質をコードするDNA；

(d) 配列番号2で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2で表される塩基配列を有するDNAがコードするタンパク質の活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項18】 以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれるゲノムDNAを標的とし、遺伝子破壊の手法を用いることによって、該ゲノムDN

A上のエクソンにコードされるタンパク質の活性が抑制された細胞。

- (a) 配列番号3で表される塩基配列を有するゲノムDNA；
- (b) 配列番号3で表される塩基配列を有するゲノムDNAのシンテニーに相当する異種ゲノムDNA。
- (c) 配列番号3で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【請求項19】 遺伝子破壊の手法が、リボザイム法、相同組換え法、RDO法、RNAi法又はトランスポゾンを用いた遺伝子破壊の手法である、請求項18に記載の細胞。

【請求項20】 細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、又は植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、請求項1～19のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項21】 動物細胞が、以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(i)からなる群から選ばれる細胞である、請求項20に記載の細胞。

- (a) チャイニーズハムスター卵巢組織由来CHO細胞；
- (b) ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞；
- (c) マウスミエローマ細胞株NS0細胞；
- (d) マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14細胞；
- (e) シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞；
- (f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；
- (g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
- (h) 胚性幹細胞；
- (i) 受精卵細胞。

【請求項22】 糖タンパク質が免疫機能分子である、請求項1～21のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項23】 親株が生産する免疫機能分子より、エフェクター機能が高い免疫機能分子を生産する能力を有する、請求項1～22のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項 24】 エフェクター機能が高い免疫機能分子が、N-グリコシル結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていない糖鎖を有する免疫機能分子である、請求項 23 に記載の細胞。

【請求項 25】 親株が生産する免疫機能分子より、エフェクター機能が低い免疫機能分子を生産する能力を有する、請求項 1～22 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 26】 エフェクター機能が低い免疫機能分子が、N-グリコシル結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されている糖鎖を有する免疫機能分子である、請求項 25 に記載の細胞。

【請求項 27】 付加する糖がフコースである、請求項 24 又は 26 に記載の細胞。

【請求項 28】 エフェクター機能がFc領域を介した細胞障害活性である、請求項 23～27 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 29】 細胞障害活性が抗体依存性細胞障害活性である、請求項 28 に記載の細胞。

【請求項 30】 免疫機能分子をコードする遺伝子を導入した、請求項 1～29 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 31】 免疫機能分子がタンパク質又はペプチドである、請求項 22～30 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 32】 タンパク質が、抗体、抗体の断片又は抗体のFc領域を有する融合タンパク質である、請求項 31 に記載の細胞。

【請求項 33】 抗体が、腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体である、請求項 32 に記載の細胞。

【請求項 34】 腫瘍関連抗原を認識する抗体が抗GD2抗体、抗GD3抗体、抗GM2抗体、抗HER2抗体、抗CD52抗体、抗MAGE抗体、抗HM1.24抗体、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白(PTHrP)抗体、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗FGF8抗体、抗FG

F8 受容体抗体、抗インスリン様増殖因子抗体、抗PMSA抗体、抗血管内皮細胞増殖因子抗体または抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体であり、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体が抗インターロイキン6抗体、抗インターロイキン6受容体抗体、抗インターロイキン5抗体、抗インターロイキン5受容体抗体、抗インターロイキン4抗体、抗インターロイキン4受容体抗体、抗腫瘍壊死因子抗体、抗腫瘍壊死因子受容体抗体、抗CCR4抗体、抗ケモカイン抗体または抗ケモカイン受容体抗体であり、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗GpIIb/IIIa抗体、抗血小板由来増殖因子抗体、抗血小板由来増殖因子受容体抗体または抗血液凝固因子抗体であり、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗自己DNA抗体であり、ウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体が抗gp120抗体、抗CD4抗体、抗CCR4抗体または抗ベロ毒素抗体である、請求項33に記載の細胞。

【請求項35】 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が制御されるようにそのゲノムが改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

【請求項36】 ノックアウト動物あるいは植物である、請求項35に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

【請求項37】 請求項21に記載の胚性幹細胞または受精卵細胞を用いて作製された、請求項35又は36に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

【請求項38】 トランスジェニック非ヒト動物が、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル及びウサギからなる群から選ばれる、請求項35～37のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

【請求項39】 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素が糖転移酵素である、請求項35～38のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

【請求項40】 糖転移酵素が、その活性の低下により該酵素を含む細胞の増殖に影響を及ぼさない糖転移酵素である、請求項39に記載のトランスジェニッ

ク非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

【請求項 4 1】 糖転移酵素が、その活性の増大により該酵素を含む細胞の増殖に影響を及ぼさない糖転移酵素である、請求項 3 9 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

【請求項 4 2】 糖転移酵素が、N-グリコシル結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖を付加する活性を有する酵素である、請求項 3 9 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

【請求項 4 3】 付加する糖がフコースである、請求項 4 2 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

【請求項 4 4】 糖転移酵素がフコシルトランスフェラーゼである、請求項 3 9 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

【請求項 4 5】 糖転移酵素が、 $\alpha$ -1, 6-フコシルトランスフェラーゼである、請求項 3 9 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

【請求項 4 6】 請求項 1 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中に免疫機能分子を生成蓄積させ、該培養物から免疫機能分子を精製する工程を含む、免疫機能分子を製造する方法。

【請求項 4 7】 請求項 1 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の細胞を生体に移植し、移植された生体を飼育し、移植された生体から目的とする物質を含む個体、組織あるいは体液を取得し、取得した個体、組織あるいは体液から免疫機能分子を精製する工程を含む、免疫機能分子を製造する方法。

【請求項 4 8】 人為的手法を施さなかった細胞を用いて製造した免疫機能分子よりもエフェクター機能が高い免疫機能分子を製造する、請求項 4 6 又は 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】 人為的手法を施さなかった細胞を用いて製造した免疫機能分子よりもエフェクター機能が低い免疫機能分子を製造する、請求項 4 6 又は 4 7 に記載の方法。

【請求項 50】 請求項 35～45 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫を飼育し、該動物あるいは植物から目的とする物質を含む組織あるいは体液を取得し、取得した組織あるいは体液から免疫機能分子を精製する工程を含む、免疫機能分子を製造する方法。

【請求項 51】 ゲノムが改変されていない非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫から得られる免疫機能分子よりもエフェクター機能が低い免疫機能分子を製造する、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】 ゲノムが改変されていない非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫から得られる免疫機能分子よりもエフェクター機能が低い免疫機能分子を製造する、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 53】 エフェクター機能が Fc 領域を介した細胞障害活性である、請求項 48～52 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 54】 細胞障害活性が抗体依存性細胞障害活性である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】 免疫機能分子がタンパク質又はペプチドである、請求項 46～54 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 56】 タンパク質が、抗体、抗体の断片または抗体の Fc 領域を有する融合タンパク質である、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 57】 抗体が、腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体である、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】 腫瘍関連抗原を認識する抗体が抗 GD2 抗体、抗 GD3 抗体、抗 GM2 抗体、抗 HER2 抗体、抗 CD52 抗体、抗 MAGE 抗体、抗 HM1.24 抗体、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) 抗体、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗 FGF8 抗体、抗 FGF8 受容体抗体、抗インスリン様増殖因子抗体、抗 PMSA 抗体、抗血管内皮細胞増殖因子抗体または抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体であり、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体が抗インターロイキン 6 抗体、抗イン



ターロイキン6受容体抗体、抗インターロイキン5抗体、抗インターロイキン5受容体抗体、抗インターロイキン4抗体、抗インターロイキン4受容体抗体、抗腫瘍壊死因子抗体、抗腫瘍壊死因子受容体抗体、抗CCR4抗体、抗ケモカイン抗体または抗ケモカイン受容体抗体であり、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗GpIIb/IIIa抗体、抗血小板由来増殖因子抗体、抗血小板由来増殖因子受容体抗体または抗血液凝固因子抗体であり、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗自己DNA抗体であり、ウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体が抗gp120抗体、抗CD4抗体、抗CCR4抗体または抗ペロ毒素抗体である、請求項57に記載の方法。

【請求項59】 請求項46～58のいずれか1項に記載の方法を用いて製造された免疫機能分子。

【請求項60】 N-グリコシド結合糖鎖を有する免疫機能分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれる、還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合が該組成物中に含まれる全N-グリコシド結合糖鎖の20%以上である免疫機能分子組成物。

【請求項61】 N-グリコシド結合糖鎖を有する免疫機能分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれる、還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合が該組成物中に含まれる全N-グリコシド結合糖鎖の10%以下である免疫機能分子組成物。

【請求項62】 N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていない糖鎖の割合を高めて得られ、且つもとの免疫機能分子組成物と比べて高いエフェクター機能を有する、請求項60に記載の免疫機能分子組成物。

【請求項63】 高いエフェクター機能が、もとの免疫機能分子組成物と比べて10倍以上高いエフェクター機能である、請求項62に記載の免疫機能分子組成物。

【請求項64】 N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていない糖鎖の割合を低めて得られ、且つもとの免疫機能分子組成物と比べて低いエフェクター機能を有する、請求項61に記載の免疫機能分子組成物。

子組成物。

【請求項 65】 低いエフェクター機能がもとの免疫機能分子組成物と比べて 1/10 以下のエフェクター機能である、請求項 64 に記載の免疫機能分子組成物。

【請求項 66】 エフェクター機能が Fc 領域を介した細胞障害活性である、請求項 62～65 のいずれか 1 項に記載の免疫機能分子組成物。

【請求項 67】 細胞障害活性が抗体依存性細胞障害活性である、請求項 66 に記載の免疫機能分子組成物。

【請求項 68】 N-グリコシド結合糖鎖が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる糖鎖である、請求項 60～67 のいずれか 1 項に記載の免疫機能分子組成物。

- (a) ハイマンノース型糖鎖；
- (b) コンプレックス型糖鎖；
- (c) ハイブリッド型糖鎖。

【請求項 69】 N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンに糖が付加されていない糖鎖が、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが付加されていない糖鎖である、請求項 60～68 のいずれか 1 項に記載の免疫機能分子組成物。

【請求項 70】 免疫機能分子を生産できる細胞を培地に培養し、培養物中に免疫機能分子を生成蓄積させ、該培養物から目的とする組成物を精製する工程によって製造された、請求項 60～69 のいずれか 1 項に記載の免疫機能分子組成物。

【請求項 71】 細胞が、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、又は植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、請求項 70 に記載の免疫機能分子組成物。

【請求項 72】 動物細胞が、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h) 及び (i) からなる群から選ばれる細胞である、請求項 71 に記載の免疫機能分子組成物。

- (a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞；
- (b) ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20

細胞；

- (c) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞；
- (d) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞；
- (e) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；
- (f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；
- (g) ヒト白血病細胞株 ナマルバ細胞；
- (h) 胚性幹細胞；
- (i) 受精卵細胞。

【請求項 73】 トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、又はその子孫を飼育し、該動物あるいは植物から目的とする物質を含む組織あるいは体液を取得し、取得した組織あるいは体液から目的とする物質を精製する工程によって製造された、請求項 60～69 のいずれか 1 項に記載の免疫機能分子組成物。

【請求項 74】 トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、又はその子孫が、ノックアウト動物あるいは植物、又はその子孫である、請求項 73 に記載の免疫機能分子組成物。

【請求項 75】 トランスジェニック非ヒト動物が、請求項 21 に記載の胚性幹細胞または受精卵細胞を用いて作製されたトランスジェニック非ヒト動物である、請求項 73 または 74 の免疫機能分子組成物。

【請求項 76】 トランスジェニック非ヒト動物が、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル及びウサギからなる群から選ばれるトランスジェニック非ヒト動物である、請求項 73～75 のいずれか 1 項に記載の免疫機能分子組成物。

【請求項 77】 免疫機能分子がタンパク質又はペプチドである、請求項 60～76 のいずれか 1 項に記載の免疫機能分子組成物。

【請求項 78】 タンパク質が、抗体、抗体の断片又は抗体の Fc 領域を有する融合タンパク質である、請求項 77 に記載の免疫機能分子組成物。

【請求項 79】 抗体が、腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギー又は炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルス又は細菌感染に関連す

る抗原を認識する抗体である、請求項 78 に記載の免疫機能分子組成物。

【請求項 80】 腫瘍関連抗原を認識する抗体が抗 GD2 抗体、抗 GD3 抗体、抗 GM2 抗体、抗 HER2 抗体、抗 CD52 抗体、抗 MAGE 抗体、抗 HM1.24 抗体、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) 抗体、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗 FGF8 抗体、抗 FGF8 受容体抗体、抗インスリン様増殖因子抗体、抗 PMSA 抗体、抗血管内皮細胞増殖因子抗体または抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体であり、アレルギー又は炎症に関連する抗原を認識する抗体が抗インターロイキン 6 抗体、抗インターロイキン 6 受容体抗体、抗インターロイキン 5 抗体、抗インターロイキン 5 受容体抗体、抗インターロイキン 4 抗体、抗インターロイキン 4 受容体抗体、抗腫瘍壊死因子抗体、抗腫瘍壊死因子受容体抗体、抗 CCR4 抗体、抗ケモカイン抗体または抗ケモカイン受容体抗体であり、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗 Gp11b/11a 抗体、抗血小板由来増殖因子抗体、抗血小板由来増殖因子受容体抗体または抗血液凝固因子抗体であり、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗自己 DNA 抗体であり、ウイルス又は細菌感染に関連する抗原を認識する抗体が抗 gp120 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CCR4 抗体または抗ペロ毒素抗体である、請求項 79 に記載の免疫機能分子組成物。

【請求項 81】 請求項 59 に記載の免疫機能分子又は請求項 60～80 のいずれか 1 項に記載の免疫機能分子組成物を有効成分として含有する医薬。

【請求項 82】 医薬が、腫瘍を伴う疾患、アレルギーを伴う疾患、炎症を伴う疾患、循環器疾患、自己免疫疾患、ウイルス感染を伴う疾患または細菌感染を伴う疾患に対する診断薬、予防薬又は治療薬である、請求項 81 に記載の医薬。

【請求項 83】 N-グリコシド結合糖鎖を有する免疫機能分子からなる組成物中に含まれる、還元末端の N-アセチルグルコサミンに糖が付加されていない N-グリコシド結合糖鎖の割合を変化させることを特徴とする、所望のエフェクター機能を有する医薬を調製する方法。

【請求項 84】 所望のエフェクター機能を有する医薬が、N-グリコシド結合糖鎖を有する免疫機能分子からなる組成物中に含まれる、還元末端の N-アセ

チルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合を高めて得られ、且つもとの医薬と比べて高いエフェクター機能を有する医薬である、請求項83に記載の方法。

【請求項85】 高いエフェクター機能が、もとの医薬と比べて10倍以上高いエフェクター機能である、請求項84に記載の方法。

【請求項86】 N-グリコシド結合糖鎖を有する免疫機能分子からなる組成物中に含まれる、還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合を該組成物中の全N-グリコシド結合糖鎖の20%以上となるように調節する、請求項84又は85に記載の方法。

【請求項87】 所望のエフェクター機能を有する医薬が、N-グリコシド結合糖鎖を有する免疫機能分子からなる組成物に含まれる、還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合を低めて得られ、且つもとの医薬と比べて低いエフェクター機能を有する医薬である、請求項83に記載の方法。

【請求項88】 低いエフェクター機能が、もとの医薬と比べて1/10以下のエフェクター機能である、請求項87に記載の方法。

【請求項89】 N-グリコシド結合糖鎖を有する免疫機能分子からなる組成物中に含まれる、還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合を該組成物中の全N-グリコシド糖鎖の10%以下となるように調節する、請求項87又は88に記載の方法。

【請求項90】 エフェクター機能がFc領域を介した細胞障害活性である、請求項83～89のいずれか1項に記載の方法。

【請求項91】 細胞障害活性が抗体依存性細胞障害活性である、請求項90に記載の方法。

【請求項92】 N-グリコシド結合糖鎖が、以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれる糖鎖である、請求項83～91のいずれか1項に記載の方法。

(a) ハイマンノース型糖鎖；

(b) コンプレックス型糖鎖；

(c) ハイブリッド型糖鎖。

【請求項 93】 N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていない糖鎖が、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが付加されていない糖鎖である、請求項 83～92のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 94】 請求項 83～93のいずれか1項に記載の方法によって調製された医薬。

【請求項 95】 医薬が、腫瘍を伴う疾患、アレルギーを伴う疾患、炎症を伴う疾患、循環器疾患、自己免疫疾患、ウイルス感染を伴う疾患または細菌感染を伴う疾患に対する診断薬、予防薬又は治療薬である、請求項 94に記載の医薬。

【請求項 96】 請求項 5に記載の(a)～(e)からなる群から選ばれる人為的手法により細胞を選択あるいは改変する工程と、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性又は糖タンパク質の糖鎖の構造を指標に所望の細胞を選択する工程を含む、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が制御された細胞の製造方法。

【請求項 97】 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性又は糖タンパク質の糖鎖の構造を指標に所望の細胞を選択する工程を含む、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が制御された細胞のスクリーニング方法。

【請求項 98】 糖タンパク質の糖鎖の構造を指標に所望の細胞を選択する工程が、N-グリコシル結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンへの糖の付加の有無を指標に所望の細胞を選択する工程である、請求項 96又は97に記載の方法。

【請求項 99】 付加する糖がフコースである、請求項 98に記載の方法。

【請求項 100】 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素が糖転移酵素である、請求項 96～99のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 101】 糖転移酵素が、その活性の低下により該酵素を含む細胞の増殖に影響を及ぼさない糖転移酵素である、請求項 100に記載の方法。

【請求項 102】 糖転移酵素が、その活性の増大により該酵素を含む細胞の

増殖に影響を及ぼさない糖転移酵素である、請求項100に記載の方法。

【請求項103】 糖転移酵素が、N-グリコシル結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖を付加する活性を有する酵素である、請求項100～102のいずれか1項に記載の方法。

【請求項104】 付加する糖がフコースである、請求項103に記載の方法。

【請求項105】 糖転移酵素がフコシルトランスフェラーゼである、請求項100～104のいずれか1項に記載の方法。

【請求項106】 糖転移酵素が、 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼである、請求項100～105のいずれか1項に記載の方法。

【請求項107】 糖タンパク質が免疫機能分子である、請求項96～106のいずれか1項に記載の方法。

【請求項108】 免疫機能分子が、N-グリコシル結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていない糖鎖を有する免疫機能分子である、請求項107に記載の方法。

【請求項109】 免疫機能分子が、N-グリコシル結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されている糖鎖を有する免疫機能分子である、請求項107に記載の方法。

【請求項110】 付加する糖がフコースである、請求項108又は109に記載の方法。

【請求項111】 免疫機能分子がタンパク質又はペプチドである、請求項107～110のいずれか1項に記載の方法。

【請求項112】 タンパク質が、抗体、抗体の断片又は抗体のFc領域を有する融合タンパク質である、請求項111に記載の方法。

【請求項113】 抗体が、腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体である、請求項112に記載の方法。

【請求項114】 腫瘍関連抗原を認識する抗体が抗GD2抗体、抗GD3抗

体、抗GM2抗体、抗HER2抗体、抗CD52抗体、抗MAGE抗体、抗HM1.24抗体、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白(PTHrP)抗体、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗FGF8抗体、抗FGF8受容体抗体、抗インスリン様増殖因子抗体、抗PMSA抗体、抗血管内皮細胞増殖因子抗体または抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体であり、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体が抗インターロイキン6抗体、抗インターロイキン6受容体抗体、抗インターロイキン5抗体、抗インターロイキン5受容体抗体、抗インターロイキン4抗体、抗インターロイキン4受容体抗体、抗腫瘍壊死因子抗体、抗腫瘍壊死因子受容体抗体、抗CCR4抗体、抗ケモカイン抗体または抗ケモカイン受容体抗体であり、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗GpIIb/IIIa抗体、抗血小板由来増殖因子抗体、抗血小板由来増殖因子受容体抗体または抗血液凝固因子抗体であり、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗自己DNA抗体であり、ウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体が抗gp120抗体、抗CD4抗体、抗CCR4抗体または抗ペロ毒素抗体である、請求項113に記載の方法。

【請求項115】 配列表の配列番号1で表される塩基配列を有するDNA。

【請求項116】 配列表の配列番号2で表される塩基配列を有するDNA。

【請求項117】 以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれるゲノムDNA:

(a) 配列番号3で表される塩基配列を有するゲノムDNA;

(b) 配列番号3で表される塩基配列を有するゲノムDNAのシンテニーに相当する異種ゲノムDNA。

(c) 配列番号3で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするゲノムDNA。

【請求項118】 請求項115～117のいずれか1項に記載のDNAを含むターゲットベクター。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】



本発明は、種々の疾患に有用な抗体、抗体の断片、抗体の F c 領域を有する融合タンパク質またはペプチドなどの免疫機能分子等の糖タンパク質の製造に用いる細胞、該細胞を用いた免疫機能分子の製造方法、免疫機能分子、およびその用途に関する。

#### 【 0 0 0 2 】

##### 【従来の技術】

抗体は、高い結合活性、結合特異性及び血中での高い安定性を有することから、ヒトの各種疾患の診断、予防及び治療への応用が試みられてきた [モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 2.1 (1995)]。また、遺伝子組換え技術を利用して、ヒト以外の動物の抗体からヒト型キメラ抗体或いはヒト型相補性決定領域（以下、CDRと表記する）移植抗体の様なヒト化抗体を作製することが試みられている。ヒト型キメラ抗体とは、抗体可変領域（以下、V領域と表記する）がヒト以外の動物の抗体で、定常領域（以下、C領域と表記する）がヒト抗体である抗体である。ヒト型CDR移植抗体とは、ヒト抗体のCDRをヒト以外の動物の抗体のCDRと置換した抗体である。

#### 【 0 0 0 3 】

哺乳類の抗体には、IgM、IgD、IgG、IgA、IgEの5種類のクラスが存在することが明らかとなっているが、ヒトの各種疾患の診断、予防及び治療には血中半減期が長く、各種エフェクター機能を有する等の機能特性からヒトIgGクラスの抗体が主として利用されている [モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 1 (1995)]。ヒトIgGクラスの抗体は、更にIgG1、IgG2、IgG3、IgG4の4種類のサブクラスに分類されている。IgGクラスの抗体のエフェクター機能である抗体依存性細胞障害活性（以下、ADCC活性と表記する）や補体依存性細胞障害活性（以下、CDC活性と表記する）については、これまでに多数の研究が行われ、ヒトIgGクラスでは、IgG1サブクラスの抗体が最も高いADCC活性、CDC活性を有していることが報告されている [ケミカル・イムノロジー (Chemical Immunology), 65, 88 (1997)]。以上の観点から、上記の

リツキサン、ハーセプチンを始めとして、その効果発現に高いエフェクター機能を必要とする抗腫瘍ヒト化抗体の殆どはヒトIgG1サブクラスの抗体である。

#### 【 0 0 0 4 】

ヒトIgG1サブクラスの抗体のADCC活性及びCDC活性の発現には、抗体Fc領域と、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、活性化されたマクロファージ等のエフェクター細胞表面上に存在する抗体レセプター（以下、Fc $\gamma$ Rと表記する）及び各種補体成分との結合が必要であり、その結合については、抗体のヒンジ領域及びC領域の第2番目のドメイン（以下、C $\gamma$ 2ドメインと表記する）内のいくつかのアミノ酸残基の重要性 [ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・イムノロジー (Eur. J. Immunol.), 23, 1098 (1993)、イムノロジー (Immunology), 86, 319 (1995)、ケミカル・イムノロジー (Chemical Immunology), 65, 88 (1997)] の他、C $\gamma$ 2ドメインに結合している糖鎖の重要性 [ケミカル・イムノロジー (Chemical Immunology), 65, 88 (1997)] が示唆されている。

#### 【 0 0 0 5 】

糖鎖に関しては、ボイド (Boyd) らは、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO細胞) 或いはマウスミエローマNS0細胞 (NS0細胞) で生産したヒト型CDR移植抗体CAMPATH-1H (ヒトIgG1サブクラス) を各種糖分解酵素で処理し、糖鎖のADCC活性、CDC活性に対する影響を検討した結果、非還元末端のシアル酸の除去は、両活性に影響を与えないが、更にガラクトース残基を除去することでCDC活性のみが影響を受け、約50%程度活性が低下すること、糖鎖の完全な除去は、両活性を消失させることを報告した [モレキュラー・イムノロジー (Molecular Immunol.), 32, 1311 (1995)]。また、ライフリー (Lifely) らは、CHO細胞、NS0細胞或いはラットミエローマY0細胞で生産したヒト型CDR移植抗体CAMPATH-1H (ヒトIgG1サブクラス) の糖鎖の分析及びADCC活性を測定した結果、Y0細胞由来のCAMPATH-1Hが最も高いADCC活性を示し、その活性にはバイセクティングに位置するN-アセチルグルコサミン (以下、GlcNAcとも表記する) が重要であることを示唆した [グリコバイオロジー (Glycobiology), 5, 813 (1995) : W099/54342]。これらの報告は、ヒトIgG1サブクラスの抗体のエフェクター機能に糖鎖の構造が極めて重要な役割を果たしており、糖鎖の構造を変えることでより高いエフェクター機能

を有する抗体を作製することが可能であることを示している。しかし、実際には糖鎖の構造は多様かつ複雑であり、エフェクター機能に真に重要な構造を特定できたとは言い難い。

### 【0006】

糖タンパク質の糖鎖は、タンパク質部分との結合様式により、アスパラギンと結合する糖鎖（N-グリコシド結合糖鎖）とセリン、スレオニンなどと結合する糖鎖（O-グリコシル結合糖鎖）の2種類に大別される。N-グリコシド結合糖鎖は、様々な構造を有しているが〔生物化学実験法23-糖タンパク質糖鎖研究法（学会出版センター）高橋禮子編（1989年）〕、いずれの場合も以下の構造式（I）に示す基本となる共通のコア構造を有することが知られている。

### 【0007】

#### 【化1】

構造式（I）



### 【0008】

アスパラギンと結合する糖鎖の末端が還元末端、反対側が非還元末端と呼ばれている。N-グリコシド結合糖鎖には、コア構造の非還元末端にマンノースのみが結合するハイマンノース型、コア構造の非還元末端側にガラクトース-N-アセチルグルコサミン（以下、Gal-GlcNAcと表記する）の枝を並行して1ないしは複数本有し、更にGal-GlcNAcの非還元末端側にシアル酸、バイセクティングのN-アセチルグルコサミンなどの構造を有するコンプレックス型、コア構造の非還元末端側にハイマンノース型とコンプレックス型の両方の枝を持つハイブリッド型などがあることが知られている。

### 【0009】

抗体IgG分子のFc領域には、2個所のN-グリコシド型の糖鎖結合部位が存在しており、血清中のIgGでは、通常、この部位に、シアル酸やバイセクティン

グのN-アセチルグルコサミンの付加の程度が少ない複数本の枝を持つコンプレックス型糖鎖が結合している。このコンプレックス型糖鎖の非還元末端でのガラクトースの付加および還元末端のN-アセチルグルコサミンへのフコースの付加に関しては多様性があることが知られている[バイオケミストリー(Biochemistry), 36, 130, 1997]。

#### 【0010】

このような糖鎖の構造は、糖鎖遺伝子、すなわち、糖鎖を合成する糖転移酵素と糖鎖を分解する糖分解酵素の遺伝子によって規定されていると考えられている。

#### 【0011】

以下に、N-グリコシド結合糖鎖の生合成に関して述べる。

糖タンパク質は、小胞体（以下、ERと表記する）内腔で糖鎖の修飾を受ける。N-グリコシド結合糖鎖の生合成過程では、比較的大きな糖鎖が、ER内腔で伸長しつつあるポリペプチド鎖に転移される。この際、糖鎖はまず、ドリコールリン酸（以下、P-Dolとも表記する）と呼ばれる $\alpha$ -イソプレン単位を20個程度含む長鎖の脂質担体のリン酸基に順次付加される。すなわち、ドリコールリン酸にN-アセチル-グルコサミンが転移されGlcNAc-P-P-Dolとなり、続いてもう1個GlcNAcが転移されGlcNAc-GlcNAc-P-P-Dolとなる。次いで、マンノース（以下、Manとも表記する）が5個転移され $(\text{Man})_5-(\text{GlcNAc})_2\text{-P-P-Dol}$ に、さらに、Manが4個、グルコース（以下、Glcとも表記する）が3個転移される。このようにして、コアオリゴ糖と呼ばれる糖鎖の前駆体 $(\text{Glc})_3-(\text{Man})_9-(\text{GlcNAc})_2\text{-P-P-Dol}$ ができる。この14個の糖からなる糖鎖の前駆体はアスパラギン-X-セリンまたはアスパラギン-X-スレオニン配列を持ったポリペプチドへER内腔でひとかたまりのまま転移される。この際、コアオリゴ糖に結合していたドリコールピロリン酸（P-P-Dol）は遊離するが、ピロホスファターゼの分解を受けて再びドリコールリン酸となり再利用される。糖鎖のトリミングは、糖鎖がポリペプチドに結合すると直ちに開始される。すなわち、3個のGlcと1ないし2個のManがER上で除去され、この除去には $\alpha-1, 2$ -グルコシダーゼI、 $\alpha-1, 3$ -グルコシダーゼIIおよび $\alpha-1, 2$ -マンノシダーゼが関与するこ

とが知られている。

#### 【0012】

ER上でトリミングを受けた糖タンパク質はゴルジ体へ輸送され様々な修飾を受ける。ゴルジ体シス部には、マンノースリン酸を付加するN-アセチルグルコサミンホスホトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミン1-ホスホジエステル $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼおよび $\alpha$ -マンノシダーゼIが存在し、Man残基を5個にまで減少させる。ゴルジ体メディア部には、コンプレックス型のN-グリコシド結合糖鎖の最初の外側のGlcNAcを付加するN-アセチルグルコサミン転移酵素I (GnTI)、2個のManを除去する $\alpha$ -マンノシダーゼII、外側から2個目のGlcNAcを付加するN-アセチルグルコサミン転移酵素II (GnTII)、還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースを付加する $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼが存在する。ゴルジ体トランス部にはガラクトースを付加するガラクトース転移酵素、N-アセチルノイラミン酸などのシアル酸を付加するシアル酸転移酵素が存在する。このような各種酵素の作用を受けてN-グリコシド結合糖鎖が作られることが知られている。

#### 【0013】

一般的に、医薬への応用が考えられているヒト化抗体の多くは、遺伝子組換え技術を用いて作製され、チャイニーズハムスター卵巣組織由来CHO細胞を宿主細胞として用い製造されているが、上述したように、抗体のエフェクター機能には糖鎖構造が極めて重要な役割を担っていること、宿主細胞によって発現された糖タンパク質の糖鎖構造に違いが観察されることから、より高いエフェクター機能を有する抗体を作製することが可能な宿主細胞の開発が望まれている。

生産される糖タンパク質の糖鎖構造を改変するために、1) 糖鎖の修飾に係わる酵素の阻害剤の応用、2) 突然変異体の選択、3) 糖鎖の修飾に係わる酵素遺伝子の導入などの方法が試みられている。以下に、それら具体的例を述べる。

#### 【0014】

糖鎖の修飾に係わる酵素の阻害剤としては、N-グリコシド結合糖鎖の前駆体であるコアオリゴ糖形成の最初のステップであるGlcNAc-P-P-Dolの形成を選択的に阻害するツニカマイシン、グリコシダーゼIの阻害剤であるカスパトスベル

ミンやN-メチル-1-デオキシノジリマイシン、グルコシダーゼIIの阻害剤であるブロモコンヅリトール、マンノシダーゼIの阻害剤である1-デオキシノジリマイシンや1,4-ジオキシー-1,4-イミノ-D-マンニトール、マンノシダーゼIIの阻害剤であるスワンソニンなどが知られている。糖転移酵素の特異的な阻害剤としては、N-アセチルグルコサミン転移酵素V (GnTV) などに対する基質のデオキシ誘導体が開発されてつつある[グライコバイオロジーシリーズ2-糖鎖の細胞における運命 (講談社サンエンティフィック) 永井克孝・箱守仙一朗・木幡陽編(1993)]。また、1-デオキシノジリマイシンはコンプレックス型糖鎖の合成を抑え、ハイマンノース型やハイブリッド型糖鎖の割合を増加させることが知られている。実際に、これら阻害剤を培地に添加することでIgGの糖鎖構造が変化し、抗原結合性などが変化することが報告されている[モレキュラー・イムノロジー(Molecular Immunol.), 26, 1113, (1989)]。

#### 【0015】

糖鎖の修飾に係わる酵素の活性に関する突然変異体は、主に、レクチン耐性株として選択され取得されている。例えば、WGA(*T. vulgaris*由来のwheat-germ agglutinin)、ConA(*C. ensiformis*由来のconcanavalin A)、RIC(*R. communis*由来の毒素)、L-PHA(*P. vulgaris*由来のleukoagglutinin)、LCA(*L. culinaris*由来のlentil agglutinin)、PSA(*P. sativum*由来のPea lectin)などのレクチンを用い、様々な糖鎖構造を有するCHO細胞変異株がレクチン耐性株として取得されている[ソマティック・セル・アンド・モレキュラー・ジェネティクス (Somatic Cell Mol. Genet.), 12, 51, (1986)]。

#### 【0016】

糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子を宿主細胞に導入して生産物の糖鎖構造を改変した例としては、ラットの $\beta$ -ガラクトシド- $\alpha$ -2,6-シアリルトランスフェラーゼをCHO細胞に導入することで糖鎖の非還元末端にシアル酸が多く付加されたタンパク質の製造が可能であることが報告されている[ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 261, 13848, 1989]。

また、ヒトの $\beta$ -ガラクトシド-2- $\alpha$ -フコシルトランスフェラーゼをマウスL細胞に導入することで糖鎖の非還元末端にフコース (以下、Fucとも表記す

る) が付加された H 抗原 (Fuc  $\alpha$  1-2Gal  $\beta$  1-) の発現が確認されている [サイエンス (Science), 252, 1668, 1991]。さらに、ユマナ (Umana) らは、N-グリコシド結合糖鎖のバイセクティングに位置する N-アセチルグルコサミンの付加が抗体の ADCC 活性に重要であるとの知見に基づき、 $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミン転移酵素 I I I (GnT I I I) を発現させた CHO 細胞を作製し親株との比較を行っている。親株の CHO 細胞では GnT I I I の発現が観察されておらず [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 261, 13370, 1984]、作製した GnT I I I 発現 CHO 細胞を用いて発現させた抗体は親株で発現させた抗体と比べ 16 倍高い ADCC 活性を有していることを確認している [グリコバイオロジー (Glycobiology), 5, 813 (1995): W099/54342]。またこの際、ユマナ (Umana) らは、 $\beta$ -1, 4-N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT V) の遺伝子を導入した CHO 細胞も作製しており、GnT I I I または GnT V の過剰発現は CHO 細胞に対して毒性を示すことを報告している。

#### 【0017】

このように、生産される糖タンパク質の糖鎖構造を改変するために、宿主細胞の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性を調節する試みがなされているが、実際には糖鎖の構造は多様かつ複雑であり、かつ糖鎖が持つ生理的な役割の解明も十分とは言い難いため試行錯誤を繰り返しているのが現状である。特に、抗体のエフェクター機能は糖鎖構造により大きな影響を受ける事が明らかになりつつあるが、真に重要な糖鎖構造の特定には至っていない。従って、抗体のエフェクター機能に影響を及ぼす糖鎖構造の同定と、そのような糖鎖構造の付加が可能な宿主細胞の開発が医薬開発の上で求められている。

#### 【0018】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、糖タンパク質の糖鎖構造を制御できる、糖タンパク質生産用の宿主細胞として有用な細胞、特に、エフェクター機能が制御された免疫機能分子を生産することが可能な細胞、該細胞を用いた免疫機能分子の製造方法、該製造方法で製造された免疫機能分子、ならびにその用途を提供することを目的とする。

#### 【0019】

**【課題を解決するための手段】**

$\alpha-1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ遺伝子を人為的に導入した宿主細胞を作製することで、親株を宿主細胞とした場合に比べてADCC活性が低い抗体を得る事に成功した。また、 $\alpha-1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ遺伝子を人為的に破壊した宿主細胞を作製することで、親株を宿主細胞とした場合に比べてADCC活性が高い抗体を得る事に成功した。これらの知見を基に鋭意検討の結果、本発明を完成させるに至った。

**【0020】**

本発明は、以下の(1)～(118)に関する。

- (1) 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が人為的手法により低下した細胞。
- (2) 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素が、糖タンパク質の糖鎖還元末端の修飾に係わる酵素である、前記(1)に記載の細胞。
- (3) 糖タンパク質の糖鎖還元末端の修飾に係わる酵素の活性が人為的手法により制御された細胞。
- (4) 糖タンパク質の糖鎖還元末端の修飾に係わる酵素の活性が人為的手法により増大した細胞。

**【0021】**

(5) 人為的手法が、以下の(a)、(b)、(c)、(d)及び(e)からなる群から選ばれる手法である、前記(1)～(4)のいずれか1項に記載の細胞。

- (a) 前記酵素の活性の阻害剤又は活性化剤を培地に添加する手法；
  - (b) 前記酵素についての突然変異体を選択する手法；
  - (c) 前記酵素の遺伝子を導入する手法；
  - (d) 前記酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；
  - (e) 前記酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法。
- (6) 突然変異体を選択する手法が、自然発生的に生じた突然変異体又は親株を突然変異誘発処理することで生じた突然変異体を、前記酵素の活性又は糖タンパク質の糖鎖の構造を指標に所望の突然変異体を選択する手法である、前記(5)



)に記載の細胞。

上記(1)～(6)において、「前記酵素」は、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素及び糖タンパク質の糖鎖還元末端の修飾に係わる酵素の両方を包含する。

#### 【0022】

(7) 糖タンパク質の糖鎖の構造を指標に所望の突然変異体を選択する手法が、N-グリコシル結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンへの糖の付加の有無を指標に所望の突然変異体を選択する手法である、前記(6)に記載の細胞。

(8) 付加する糖がフコースである、前記(7)に記載の細胞。

(9) 遺伝子破壊の手法が、アンチセンス法、リボザイム法、相同組換え法、RDO法、RNAi法又はトランスポゾンを用いた遺伝子破壊の手法である、前記(5)に記載の細胞。

#### 【0023】

(10) 前記酵素が糖転移酵素である、前記(1)～(9)のいずれか1項に記載の細胞。

(11) 糖転移酵素が、その活性の低下により該酵素を含む細胞の増殖に影響を及ぼさない糖転移酵素である、前記(10)に記載の細胞。

(12) 糖転移酵素が、その活性の増大により該酵素を含む細胞の増殖に影響を及ぼさない糖転移酵素である、前記(10)に記載の細胞。

(13) 糖転移酵素が、N-グリコシル結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖を付加する活性を有する酵素である、前記(10)～(12)のいずれか1項に記載の細胞。

(14) 付加する糖がフコースである、前記(13)に記載の細胞。

(15) 糖転移酵素がフコシルトランスフェラーゼである、前記(10)～(14)のいずれか1項に記載の細胞。

(16) 糖転移酵素が、 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼである、前記(10)～(15)のいずれか1項に記載の細胞。

(17) 以下の(a)、(b)、(c)及び(d)からなる群から選ばれるDNAが導入されて該DNA分子がコードするタンパク質の活性が増加した細胞：

- (a) 配列番号1で表される塩基配列を有するDNA;
- (b) 配列番号2で表される塩基配列を有するDNA;
- (c) 配列番号1で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号1で表される塩基配列を有するDNAがコードするタンパク質の活性を有するタンパク質をコードするDNA;
- (d) 配列番号2で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2で表される塩基配列を有するDNAがコードするタンパク質の活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【0024】

(18) 以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれるゲノムDNAを標的とし、遺伝子破壊の手法を用いることによって、該ゲノムDNA上のエクソンにコードされるタンパク質の活性が抑制された細胞。

- (a) 配列番号3で表される塩基配列を有するゲノムDNA;
- (b) 配列番号3で表される塩基配列を有するゲノムDNAのシンテニーに相当する異種ゲノムDNA。
- (c) 配列番号3で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

(19) 遺伝子破壊の手法が、リボザイム法、相同組換え法、RDO法、RNAi法又はトランスポゾンを用いた遺伝子破壊の手法である、前記(18)に記載の細胞。

(20) 細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、又は植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、前記(1)～(19)のいずれか1項に記載の細胞。

(21) 動物細胞が、以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(i)からなる群から選ばれる細胞である、前記(20)に記載の細胞。

- (a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来CHO細胞;
- (b) ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞;
- (c) マウスミエローマ細胞株NS0細胞;

- (d) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞；
- (e) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；
- (f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；
- (g) ヒト白血病細胞株 ナマルバ細胞；
- (h) 胚性幹細胞；
- (i) 受精卵細胞。

【0025】

(22) 糖タンパク質が免疫機能分子である、前記(1)～(21)のいずれか1項に記載の細胞。

(23) 親株が生産する免疫機能分子より、エフェクター機能が高い免疫機能分子を生産する能力を有する、前記(1)～(22)のいずれか1項に記載の細胞。

(24) エフェクター機能が高い免疫機能分子が、N-グリコシル結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていない糖鎖を有する免疫機能分子である、前記(23)に記載の細胞。

(25) 親株が生産する免疫機能分子より、エフェクター機能が低免疫機能分子を生産する能力を有する、前記(1～22)のいずれか1項に記載の細胞。

(26) エフェクター機能が低い免疫機能分子が、N-グリコシル結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されている糖鎖を有する免疫機能分子である、前記(25)に記載の細胞。

(27) 付加する糖がフコースである、前記(24)又は(26)に記載の細胞。

(28) エフェクター機能がFc領域を介した細胞障害活性である、前記(23)～(27)のいずれか1項に記載の細胞。

(29) 細胞障害活性が抗体依存性細胞障害活性である、前記(28)に記載の細胞。

(30) 免疫機能分子をコードする遺伝子を導入した、前記(1)～(29)のいずれか1項に記載の細胞。

(31) 免疫機能分子がタンパク質又はペプチドである、前記(22)～(

3 0) のいずれか 1 項に記載の細胞。

【 0 0 2 6 】

( 3 2 ) タンパク質が、抗体、抗体の断片又は抗体の F c 領域を有する融合タンパク質である、前記 ( 3 1 ) に記載の細胞。

( 3 3 ) 抗体が、腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体である、前記 ( 3 2 ) に記載の細胞。

( 3 4 ) 腫瘍関連抗原を認識する抗体が抗 G D 2 抗体、抗 G D 3 抗体、抗 G M 2 抗体、抗 H E R 2 抗体、抗 C D 5 2 抗体、抗 M A G E 抗体、抗 H M 1 . 2 4 抗体、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白 ( P T H r P ) 抗体、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗 F G F 8 抗体、抗 F G F 8 受容体抗体、抗インスリン様増殖因子抗体、抗 P M S A 抗体、抗血管内皮細胞増殖因子抗体または抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体であり、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体が抗インターロイキン 6 抗体、抗インターロイキン 6 受容体抗体、抗インターロイキン 5 抗体、抗インターロイキン 5 受容体抗体、抗インターロイキン 4 抗体、抗インターロイキン 4 受容体抗体、抗腫瘍壊死因子抗体、抗腫瘍壊死因子受容体抗体、抗 C C R 4 抗体、抗ケモカイン抗体または抗ケモカイン受容体抗体であり、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗 G p I I b / I I I a 抗体、抗血小板由来増殖因子抗体、抗血小板由来増殖因子受容体抗体または抗血液凝固因子抗体であり、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗自己 D N A 抗体であり、ウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体が抗 g p 1 2 0 抗体、抗 C D 4 抗体、抗 C C R 4 抗体または抗ペロ毒素抗体である、前記 ( 3 3 ) に記載の細胞。

( 3 5 ) 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が制御されるようにそのゲノムが改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

( 3 6 ) ノックアウト動物あるいは植物である、前記 ( 3 5 ) に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(37) 前記(21)に記載の胚性幹細胞または受精卵細胞を用いて作製された、前記(35)又は(36)に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

【0027】

(38) トランスジェニック非ヒト動物が、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル及びウサギからなる群から選ばれる、前記(35)～(37)のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(39) 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素が糖転移酵素である、前記(35)～(38)のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(40) 糖転移酵素が、その活性の低下により該酵素を含む細胞の増殖に影響を及ぼさない糖転移酵素である、前記(39)に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(41) 糖転移酵素が、その活性の増大により該酵素を含む細胞の増殖に影響を及ぼさない糖転移酵素である、前記(39)に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(42) 糖転移酵素が、N-グリコシル結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖を付加する活性を有する酵素である、前記(39)～(41)のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(43) 付加する糖がフコースである、前記(42)に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(44) 糖転移酵素がフコシルトランスフェラーゼである、前記(39)～(43)のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

(45) 糖転移酵素が、 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼである、前記(39)～(44)のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。

## 【 0 0 2 8 】

( 4 6 ) 前記 ( 1 ) ～ ( 3 4 ) のいずれか 1 項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中に免疫機能分子を生成蓄積させ、該培養物から免疫機能分子を精製する工程を含む、免疫機能分子を製造する方法。

( 4 7 ) 前記 ( 1 ) ～ ( 3 4 ) のいずれか 1 項に記載の細胞を生体に移植し、移植された生体を飼育し、移植された生体から目的とする物質を含む個体、組織あるいは体液を取得し、取得した個体、組織あるいは体液から免疫機能分子を精製する工程を含む、免疫機能分子を製造する方法。

( 4 8 ) 人為的手法を施さなかった細胞を用いて製造した免疫機能分子よりもエフェクター機能が高い免疫機能分子を製造する、前記 ( 4 6 ) 又は ( 4 7 ) に記載の方法。

( 4 9 ) 人為的手法を施さなかった細胞を用いて製造した免疫機能分子よりもエフェクター機能が低い免疫機能分子を製造する、前記 ( 4 6 ) 又は ( 4 7 ) に記載の方法。

( 5 0 ) 前記 ( 3 5 ) ～ ( 4 5 ) のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫を飼育し、該動物あるいは植物から目的とする物質を含む組織あるいは体液を取得し、取得した組織あるいは体液から免疫機能分子を精製する工程を含む、免疫機能分子を製造する方法。

( 5 1 ) ゲノムが改変されていない非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫から得られる免疫機能分子よりもエフェクター機能が高い免疫機能分子を製造する、前記 ( 5 0 ) に記載の方法。

( 5 2 ) ゲノムが改変されていない非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫から得られる免疫機能分子よりもエフェクター機能が低い免疫機能分子を製造する、前記 ( 5 0 ) に記載の方法。

## 【 0 0 2 9 】

( 5 3 ) エフェクター機能が F c 領域を介した細胞障害活性である、前記 ( 4 8 ) ～ ( 5 2 ) のいずれか 1 項に記載の方法。

( 5 4 ) 細胞障害活性が抗体依存性細胞障害活性である、前記 ( 5 3 ) に記載の方法。

(55) 免疫機能分子がタンパク質又はペプチドである、前記(46)～(54)のいずれか1項に記載の方法。

(56) タンパク質が、抗体、抗体の断片または抗体のFc領域を有する融合タンパク質である、前記(55)に記載の方法。

(57) 抗体が、腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体である、前記(56)に記載の方法。

(58) 腫瘍関連抗原を認識する抗体が抗GD2抗体、抗GD3抗体、抗GM2抗体、抗HER2抗体、抗CD52抗体、抗MAGE抗体、抗HM1.24抗体、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白(PTHrP)抗体、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗FGF8抗体、抗FGF8受容体抗体、抗インスリン様増殖因子抗体、抗PMSA抗体、抗血管内皮細胞増殖因子抗体または抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体であり、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体が抗インターロイキン6抗体、抗インターロイキン6受容体抗体、抗インターロイキン5抗体、抗インターロイキン5受容体抗体、抗インターロイキン4抗体、抗インターロイキン4受容体抗体、抗腫瘍壊死因子抗体、抗腫瘍壊死因子受容体抗体、抗CCR4抗体、抗ケモカイン抗体または抗ケモカイン受容体抗体であり、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗Gp11b/IIIa抗体、抗血小板由来増殖因子抗体、抗血小板由来増殖因子受容体抗体または抗血液凝固因子抗体であり、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗自己DNA抗体であり、ウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体が抗gp120抗体、抗CD4抗体、抗CCR4抗体または抗ペロ毒素抗体である、前記(57)に記載の方法。

#### 【0030】

(59) 前記(46)～(58)のいずれか1項に記載の方法を用いて製造された免疫機能分子。

(60) N-グリコシド結合糖鎖を有する免疫機能分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれる、還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加

されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合が該組成物中に含まれる全N-グリコシド結合糖鎖の20%以上である免疫機能分子組成物。

(61) N-グリコシド結合糖鎖を有する免疫機能分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれる、還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合が該組成物中に含まれる全N-グリコシド結合糖鎖の10%以下である免疫機能分子組成物。

(62) N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていない糖鎖の割合を高めて得られ、且つもとの免疫機能分子組成物と比べて高いエフェクター機能を有する、前記(60)に記載の免疫機能分子組成物。

(63) 高いエフェクター機能が、もとの免疫機能分子組成物と比べて10倍以上高いエフェクター機能である、前記(62)に記載の免疫機能分子組成物。

#### 【0031】

(64) N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていない糖鎖の割合を低めて得られ、且つもとの免疫機能分子組成物と比べて低いエフェクター機能を有する、前記(61)に記載の免疫機能分子組成物。

(65) 低いエフェクター機能がもとの免疫機能分子組成物と比べて1/10以下のエフェクター機能である、前記(64)に記載の免疫機能分子組成物。

(66) エフェクター機能がFc領域を介した細胞障害活性である、前記(62)～(65)のいずれか1項に記載の免疫機能分子組成物。

(67) 細胞障害活性が抗体依存性細胞障害活性である、前記(66)に記載の免疫機能分子組成物。

(68) N-グリコシド結合糖鎖が、以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれる糖鎖である、前記(60)～(67)のいずれか1項に記載の免疫機能分子組成物。

(a) ハイマンノース型糖鎖；

(b) コンプレックス型糖鎖；



(c) ハイブリッド型糖鎖。

(69) N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていない糖鎖が、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが付加されていない糖鎖である、前記(60)～(68)のいずれか1項に記載の免疫機能分子組成物。

(70) 免疫機能分子を生産できる細胞を培地に培養し、培養物中に免疫機能分子を生成蓄積させ、該培養物から目的とする組成物を精製する工程によって製造された、前記(60)～(69)のいずれか1項に記載の免疫機能分子組成物。

(71) 細胞が、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、又は植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、前記(70)に記載の免疫機能分子組成物。

#### 【0032】

(72) 動物細胞が、以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(i)からなる群から選ばれる細胞である、前記(71)に記載の免疫機能分子組成物。

(a) チャイニーズハムスター卵巢組織由来CHO細胞；

(b) ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞；

(c) マウスミエローマ細胞株NS0細胞；

(d) マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14細胞；

(e) シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞；

(f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；

(g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；

(h) 胚性幹細胞；

(i) 受精卵細胞。

(73) トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、又はその子孫を飼育し、該動物あるいは植物から目的とする物質を含む組織あるいは体液を取得し、取得した組織あるいは体液から目的とする物質を精製する工程によって製造された、前記(60)～(69)のいずれか1項に記載の免疫機能分子組成物。

(74) トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、又はその子孫が、ノックアウト動物あるいは植物、又はその子孫である、前記(73)に記載の免疫機能分子組成物。

(75) トランスジェニック非ヒト動物が、前記(21)に記載の胚性幹細胞または受精卵細胞を用いて作製されたトランスジェニック非ヒト動物である、前記(73)または(74)の免疫機能分子組成物。

(76) トランスジェニック非ヒト動物が、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル及びウサギからなる群から選ばれるトランスジェニック非ヒト動物である、前記(73)～(75)のいずれか1項に記載の免疫機能分子組成物。

(77) 免疫機能分子がタンパク質又はペプチドである、前記(60)～(76)のいずれか1項に記載の免疫機能分子組成物。

(78) タンパク質が、抗体、抗体の断片又は抗体のFc領域を有する融合タンパク質である、前記(77)に記載の免疫機能分子組成物。

### 【0033】

(79) 抗体が、腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギー又は炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルス又は細菌感染に関連する抗原を認識する抗体である、前記(78)に記載の免疫機能分子組成物。

(80) 腫瘍関連抗原を認識する抗体が抗GD2抗体、抗GD3抗体、抗GM2抗体、抗HER2抗体、抗CD52抗体、抗MAGE抗体、抗HM1.24抗体、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白(PTHrP)抗体、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗FGF8抗体、抗FGF8受容体抗体、抗インスリン様増殖因子抗体、抗PMSA抗体、抗血管内皮細胞増殖因子抗体または抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体であり、アレルギー又は炎症に関連する抗原を認識する抗体が抗インターロイキン6抗体、抗インターロイキン6受容体抗体、抗インターロイキン5抗体、抗インターロイキン5受容体抗体、抗インターロイキン4抗体、抗インターロイキン4受容体抗体、抗腫瘍壊死因子抗体、抗腫瘍壊死因子受容体抗体、抗CCR4抗体、抗ケモカイン抗体また

は抗ケモカイン受容体抗体であり、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗GpI Ib/I IIa抗体、抗血小板由来増殖因子抗体、抗血小板由来増殖因子受容体抗体または抗血液凝固因子抗体であり、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗自己DNA抗体であり、ウイルス又は細菌感染に関連する抗原を認識する抗体が抗gp120抗体、抗CD4抗体、抗CCR4抗体または抗ベロ毒素抗体である、前記(79)に記載の免疫機能分子組成物。

(81) 前記(59)に記載の免疫機能分子又は前記(60)～(80)のいずれか1項に記載の免疫機能分子組成物を有効成分として含有する医薬。

(82) 医薬が、腫瘍を伴う疾患、アレルギーを伴う疾患、炎症を伴う疾患、循環器疾患、自己免疫疾患、ウイルス感染を伴う疾患または細菌感染を伴う疾患に対する診断薬、予防薬又は治療薬である、前記(81)に記載の医薬。

(83) N-グリコシド結合糖鎖を有する免疫機能分子からなる組成物中に含まれる、還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合を変化させることを特徴とする、所望のエフェクター機能を有する医薬を調製する方法。

#### 【0034】

(84) 所望のエフェクター機能を有する医薬が、N-グリコシド結合糖鎖を有する免疫機能分子からなる組成物中に含まれる、還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合を高めて得られ、且つもとの医薬と比べて高いエフェクター機能を有する医薬である、前記(83)に記載の方法。

(85) 高いエフェクター機能が、もとの医薬と比べて10倍以上高いエフェクター機能である、前記(84)に記載の方法。

(86) N-グリコシド結合糖鎖を有する免疫機能分子からなる組成物中に含まれる、還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合を該組成物中の全N-グリコシド結合糖鎖の20%以上となるように調節する、前記(84)又は(85)に記載の方法。

(87) 所望のエフェクター機能を有する医薬が、N-グリコシド結合糖鎖を有する免疫機能分子からなる組成物に含まれる、還元末端のN-アセチルグル

コサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合を低めて得られ、且つもとの医薬と比べて低いエフェクター機能を有する医薬である、前記（83）に記載の方法。

（88） 低いエフェクター機能が、もとの医薬と比べて1/10以下のエフェクター機能である、前記（87）に記載の方法。

（89） N-グリコシド結合糖鎖を有する免疫機能分子からなる組成物中に含まれる、還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合を該組成物中の全N-グリコシド糖鎖の10%以下となるように調節する、前記（87）又は（88）に記載の方法。

#### 【0035】

（90） エフェクター機能がFc領域を介した細胞障害活性である、前記（83）～（89）のいずれか1項に記載の方法。

（91） 細胞障害活性が抗体依存性細胞障害活性である、前記（90）に記載の方法。

（92） N-グリコシド結合糖鎖が、以下の（a）、（b）及び（c）からなる群から選ばれる糖鎖である、前記（83）～（91）のいずれか1項に記載の方法。

（a）ハイマンノース型糖鎖；

（b）コンプレックス型糖鎖；

（c）ハイブリッド型糖鎖。

（93） N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていない糖鎖が、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが付加されていない糖鎖である、前記（83）～（92）のいずれか1項に記載の方法。

（94） 前記（83）～（93）のいずれか1項に記載の方法によって調製された医薬。

（95） 医薬が、腫瘍を伴う疾患、アレルギーを伴う疾患、炎症を伴う疾患、循環器疾患、自己免疫疾患、ウイルス感染を伴う疾患または細菌感染を伴う疾患に対する診断薬、予防薬又は治療薬である、前記（94）に記載の医薬

。(96) 前記(5)に記載の(a)～(e)からなる群から選ばれる人為的手法により細胞を選択あるいは改変する工程と、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性又は糖タンパク質の糖鎖の構造を指標に所望の細胞を選択する工程を含む、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が制御された細胞の製造方法。

#### 【0036】

(97) 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性又は糖タンパク質の糖鎖の構造を指標に所望の細胞を選択する工程を含む、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が制御された細胞のスクリーニング方法。

(98) 糖タンパク質の糖鎖の構造を指標に所望の細胞を選択する工程が、N-グリコシル結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンへの糖の付加の有無を指標に所望の細胞を選択する工程である、前記(96)又は(97)に記載の方法。

(99) 付加する糖がフコースである、前記(98)に記載の方法。

(100) 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素が糖転移酵素である、前記(96)～(99)のいずれか1項に記載の方法。

(101) 糖転移酵素が、その活性の低下により該酵素を含む細胞の増殖に影響を及ぼさない糖転移酵素である、前記(100)に記載の方法。

(102) 糖転移酵素が、その活性の増大により該酵素を含む細胞の増殖に影響を及ぼさない糖転移酵素である、前記(100)に記載の方法。

(103) 糖転移酵素が、N-グリコシル結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖を付加する活性を有する酵素である、前記(100)～(102)のいずれか1項に記載の方法。

(104) 付加する糖がフコースである、前記(103)に記載の方法。

(105) 糖転移酵素がフコシルトランスフェラーゼである、前記(100)～(104)のいずれか1項に記載の方法。

#### 【0037】

(106) 糖転移酵素が、 $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼである

、前記(100)～(105)のいずれか1項に記載の方法。

(107) 糖タンパク質が免疫機能分子である、前記(96)～(106)のいずれか1項に記載の方法。

(108) 免疫機能分子が、N-グリコシル結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていない糖鎖を有する免疫機能分子である、前記(107)に記載の方法。

(109) 免疫機能分子が、N-グリコシル結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されている糖鎖を有する免疫機能分子である、前記(107)に記載の方法。

(110) 付加する糖がフコースである、前記(108)又は(109)に記載の方法。

(111) 免疫機能分子がタンパク質又はペプチドである、前記(107)～(110)のいずれか1項に記載の方法。

(112) タンパク質が、抗体、抗体の断片又は抗体のFc領域を有する融合タンパク質である、前記(111)に記載の方法。

#### 【0038】

(113) 抗体が、腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体である、前記(112)に記載の方法。

(114) 腫瘍関連抗原を認識する抗体が抗GD2抗体、抗GD3抗体、抗GM2抗体、抗HER2抗体、抗CD52抗体、抗MAGE抗体、抗HM1.24抗体、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白(PTHrP)抗体、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗FGF8抗体、抗FGF8受容体抗体、抗インスリン様増殖因子抗体、抗PMSA抗体、抗血管内皮細胞増殖因子抗体または抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体であり、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体が抗インターロイキン6抗体、抗インターロイキン6受容体抗体、抗インターロイキン5抗体、抗インターロイキン5受容体抗体、抗インターロイキン4抗体、抗インターロイキン4受容体抗体、抗腫

瘍壊死因子抗体、抗腫瘍壊死因子受容体抗体、抗CCR4抗体、抗ケモカイン抗体または抗ケモカイン受容体抗体であり、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗Gp11b/11a抗体、抗血小板由来増殖因子抗体、抗血小板由来増殖因子受容体抗体または抗血液凝固因子抗体であり、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗自己DNA抗体であり、ウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体が抗gp120抗体、抗CD4抗体、抗CCR4抗体または抗ペロ毒素抗体である、前記(113)に記載の方法。

(115) 配列表の配列番号1で表される塩基配列を有するDNA。

(116) 配列表の配列番号2で表される塩基配列を有するDNA。

(117) 以下の(a)、(b)及び(c)からなる群から選ばれるゲノムDNA:

(a) 配列番号3で表される塩基配列を有するゲノムDNA;

(b) 配列番号3で表される塩基配列を有するゲノムDNAのシンテニーに相当する異種ゲノムDNA。

(c) 配列番号3で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするゲノムDNA。

(118) 前記(115)～(117)のいずれか1項に記載のDNAを含むターゲットベクター。

#### 【0039】

##### 【発明の実施の形態】

本発明において、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素とは、N-グリコシド結合糖鎖の還元末端であるN-アセチルグルコサミンに糖を付加することに影響を与える酵素であればいかなる酵素も包含される。この糖の付加に影響を与えるとは、糖の付加を直接的あるいは間接的に抑制又は促進することを意味する。ここで、糖の付加を間接的に抑制又は促進するとは、糖の付加を直接的に抑制又は促進する活性を有する酵素(例えば、フコシルトランスフェラーゼ)の酵素活性に影響を与えたり、基質となる糖鎖の構造に影響を与えることである。

その例としては、 $\alpha$ -1, 2-グルコシダーゼI、 $\alpha$ -1, 3-グルコシダーゼII、 $\alpha$ -1, 2-マンノシダーゼ、N-アセチルグルコサミンホスホトラン

スフェラーゼ、N-アセチルグルコサミン-1-ホスホジエステラー  $\alpha$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ、 $\alpha$ -マンノシダーゼ I、N-アセチルグルコサミン転移酵素 I (GnTI)、 $\alpha$ -マンノシダーゼ II、N-アセチルグルコサミン転移酵素 II (GnTII)、ガラクトース転移酵素、シアル酸転移酵素、N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnTIII)、N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnTV)、FUT1、FUT2、FUT3、FUT4、FUT5、FUT6、FUT7、FUT8、FUT9 (FUT1~9については、「蛋白質核酸酵素、1998年12月号増刊、vol. 43、No. 16、2394頁」を参照) などが挙げられる。これらの中でも、FUT1、FUT2、FUT3、FUT4、FUT5、FUT6、FUT7、FUT8、FUT9等のフコシルトランスフェラーゼが好ましく、より好ましくは  $\alpha$ -1, 6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) である。

#### 【0040】

本発明において、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性を人為的手法により制御する方法とは、N-グリコシド結合糖鎖の還元末端であるN-アセチルグルコサミンに糖を付加することに影響を与える酵素の活性を人為的手法により制御する方法であればいかなる方法も包含する。

#### 【0041】

本発明において、糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が人為的手法により制御された細胞とは、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性、すなわち、N-グリコシド結合糖鎖の還元末端であるN-アセチルグルコサミンに糖を付加することに影響を与える酵素の活性が、親株より低下又は増大した細胞を包含する。このような細胞が発現する糖タンパク質では、親株が発現する糖タンパク質と比較して、N-グリコシド結合糖鎖の還元末端であるN-アセチルグルコサミンへの糖の修飾状態に相違が観察される。

#### 【0042】

本発明において、糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が人為的手法により低下した細胞とは、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性、すなわち、N-グリコシド結合糖鎖の還元末端であるN-アセチルグルコサミンに糖を付加すること



に影響を与える酵素の活性が、親株より低下又は欠失した細胞を包含する。

【0043】

本発明において、糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が人為的手法により増大した細胞とは、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性、すなわち、N-グリコシド結合糖鎖の還元末端であるN-アセチルグルコサミンに糖を付加することに影響を与える酵素の活性が、親株より増大した細胞を包含する。

【0044】

本発明でいう親株とは、糖の修飾に係わる酵素の活性を人為的手法によって変化させていない細胞株であればいかなる株も包含する。

本発明においてN-グリコシド結合糖鎖の還元末端であるN-アセチルグルコサミンに付加される糖としては、本発明の効果が得られる糖であれば、いずれのものでも用いることができる。この糖としては、トリオース、テトロース、ペントース、ヘキソース、ヘプトース等が挙げられるが、ヘキソースが好ましい。また、ヘキソースとしては、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース等が挙げられるが、特にフコースが好ましい。

また、本発明において、糖タンパク質の糖鎖としては、還元末端にN-アセチルグルコサミンが結合しているものであれば、いずれのものでも用いることができるが、前述の化1で示したオリゴ糖鎖構造を有する糖鎖が好ましい。

【0045】

また、本発明において、人為的手法とは、

(a) 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性の阻害剤又は活性化剤を培地に添加する手法；

(b) 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素についての突然変異体を選択する手法；

(c) 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子を導入する手法；

(d) 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；

(e) 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法

を包含する。

【0046】

本発明において、糖タンパク質としてはいずれのものでもよいが、プロテオグリカン以外の糖鎖部分を有する複合タンパク質であることが好ましく、免疫機能分子であることが更に好ましい。

免疫機能分子としては、生体内で、種々の免疫反応に関与する分子であればいかなるものでもよく、具体的には、タンパク質又はペプチドなどがあげられる。タンパク質又はペプチドとしては、抗体、抗体の断片または抗体のFc領域を含む融合タンパク質などがあげられる。

【0047】

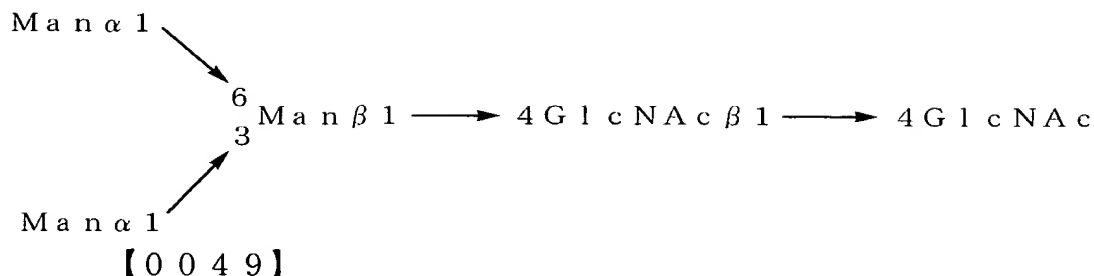
本発明において、糖タンパク質の糖鎖としては、N-グリコシド結合糖鎖が挙げられ、そのN-グリコシド結合糖鎖としては、コア構造の非還元末端にマンノースのみが結合するハイマンノース型、コア構造の非還元末端側にガラクトース-N-アセチルグルコサミン（以下、Gal-GlcNAcと表記する）の枝を並行して1ないしは複数本有し、更にGal-GlcNAcの非還元末端側にシアル酸、バイセクティングのN-アセチルグルコサミンなどの構造を有するコンプレックス型、コア構造の非還元末端側にハイマンノース型とコンプレックス型の両方の枝を持つハイブリッド型などを挙げることができる。

抗体のFc領域には、後述するN-グリコシド結合糖鎖がそれぞれ1カ所ずつ結合する領域を有しているので、抗体1分子あたり2本の糖鎖が結合している。抗体に結合するN-グリコシド結合糖鎖としては、下記構造式（I）で示されるいかなる糖鎖も包含されるので、抗体に結合する2本のN-グリコシド結合糖鎖には多数の糖鎖の組み合わせが存在することになる。したがって、Fc領域に結合した糖鎖構造の観点から物質の同一性を判断することができる。

【0048】

## 【化 2】

構造式 (1)



したがって、本発明における免疫機能分子は、本発明の効果が得られる範囲であれば、構造的に単一の化合物から構成されていてもよいし、複数の分子から構成されてもよい。「構造的に」とは、Fc領域に結合する糖鎖構造が異なることを意味する。

## 【0050】

本発明においては、免疫機能分子のN-グリコシド結合糖鎖還元末端の修飾に係る酵素の活性が人為的手法により低下した場合、その免疫機能分子のエフェクター機能が該人為的手法を施す前よりも高くなる態様が好ましい。

一方、本発明においては、免疫機能分子のN-グリコシド結合糖鎖還元末端の修飾に係る酵素の活性が人為的手法により増大した場合、その免疫機能分子のエフェクター機能が該人為的手法を施す前よりも低くなる態様が好ましい。

本発明において、免疫機能分子組成物としては、本発明の効果が得られる範囲であれば、構造的に一種の免疫機能分子から構成されるものでもよいし、構造的に2種以上の免疫機能分子から構成されるもの（所謂、混合物）も包含する。

## 【0051】

本発明において、N-グリコシド結合糖鎖を有する免疫機能分子からなる組成物に含まれる、還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合とは、該組成物に含まれる、還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されているN-グリコシド結合糖鎖および還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の合計数に対して後者のN-グリコシド結合糖鎖の数が占める割合をいう。

免疫機能分子組成物に含まれる、還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖

が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合が20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは50%以上、さらに好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上、最も好ましくは100%である免疫機能分子組成物は、還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合がより低い免疫機能分子組成物に比べ、高いエフェクター機能を有する。

#### 【0052】

高いエフェクター機能とは、例えば免疫機能分子組成物が人為的手法により酵素活性が低下した細胞から調製される抗体組成物の場合、抗体濃度が $0.00001 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ のいずれかの濃度範囲で、抗体のFc領域を介した細胞障害活性が、親株から調製される抗体組成物に比べ、少なくとも2倍以上、好ましくは5倍以上、より好ましくは10倍以上、さらに好ましくは100倍以上高いエフェクター機能を意味する。

#### 【0053】

本発明において、免疫機能分子組成物中に含まれる、還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合が10%以下、好ましくは5%以下、より好ましくは3%以下である免疫機能分子組成物は、還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合がより高い免疫機能分子組成物に比べ、低いエフェクター機能を有する。

#### 【0054】

低いエフェクター機能とは、例えば免疫機能分子組成物が人為的手法により該酵素活性が増大した細胞から調製される抗体組成物の場合、抗体濃度が $0.00001 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ のいずれかの濃度範囲で、抗体のFc領域を介した細胞障害活性が、親株から調製される抗体組成物に比べ、少なくとも $1/2$ 以下、好ましくは $1/5$ 以下、より好ましくは $1/10$ 以下、さらに好ましくは $1/100$ 以下の低いエフェクター機能を意味する。

#### 【0055】

N-グリコシド結合糖鎖を有する免疫機能分子からなる組成物中に含まれる、

還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合は、免疫機能分子からヒドラジン分解や酵素消化などの公知の方法〔生物化学実験法23-糖タンパク質糖鎖研究法（学会出版センター）高橋禮子編（1989年）〕を用い、糖鎖を遊離させ、遊離させた糖鎖を蛍光標識又は同位元素標識し、標識した糖鎖をクロマトグラフィー法にて分離することによって決定することができる。また、遊離させた糖鎖をHPAED-PAD法〔ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー（J.Liq.Chromatogr.）, 6, 1577（1983）〕によって分析することによっても決定することができる。

#### 【0056】

本発明において、抗体とは、外来抗原刺激の結果、免疫反応によって生体内に産生されるタンパク質で、抗原と特異的に結合する活性を有するものをいう。抗体としては動物に抗原を免疫し、免疫動物の脾臓細胞より作製したハイブリドーマ細胞が分泌する抗体のほか、遺伝子組換え技術により作製された抗体、すなわち、抗体遺伝子を挿入した抗体発現ベクターを、宿主細胞へ導入することにより取得された抗体などがあげられる。具体的には、ハイブリドーマが生産する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体などをあげることができる。

#### 【0057】

ハイブリドーマとは、ヒト以外の哺乳動物に抗原を免疫して取得されたB細胞と、マウス等に由来するミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる、所望の抗原特異性を有したモノクローナル抗体を産生する細胞を意味する。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型相同性決定領域（complementarity determining region:CDR）移植抗体などがあげられる。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体重鎖可変領域（以下、重鎖はH鎖として、可変領域はV領域としてHVまたはVHとも称す）および抗体軽鎖可変領域（以下、軽鎖はL鎖としてLVまたはVLとも称す）とヒト抗体の重鎖定常領域（以下、定常領域はC領域としてCHとも称す）およびヒト抗体の軽鎖定常領域（以下、CLとも称す）とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

## 【0058】

ヒト型キメラ抗体は、モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体CHおよびヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、宿主細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

## 【0059】

ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIgと表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、更にhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、hIgに属すればいかなるものでもよく、 $\kappa$ クラスあるいは $\lambda$ クラスのものを用いることができる。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体を意味する。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDR配列を任意のヒト抗体のVHおよびVLのCDR配列に移植したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびヒト抗体のCLをコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入することによりヒト型CDR移植抗体を発現させ、製造することができる。

## 【0060】

ヒト型CDR移植抗体のCHとしては、hIgに属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、更にhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型CDR移植抗体のCLとしては、hIgに属すればいかなるものでもよく、 $\kappa$ クラスあるいは $\lambda$ クラスのものを用いることができる。

## 【0061】

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体を意味するが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファ

ージライブラリーならびにヒト抗体産生トランスジェニック動物あるいはヒト抗体産生トランスジェニック植物から得られる抗体等も含まれる。

ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EBウイルス等を感染させ不死化、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養物中より該抗体を精製することができる。

#### 【0062】

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりFab、一本鎖抗体等の抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、2本の完全なH鎖および2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

#### 【0063】

ヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組み込まれた動物を意味する。具体的には、マウスES細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ES細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。また、動物の受精卵にヒト抗体遺伝子を導入し、該受精卵を発生させることにヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することもできる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを得、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

トランスジェニック非ヒト動物は、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル又はウサギ等が挙げられる。

#### 【0064】

また、本発明において、抗体が、腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスあるいは

細菌感染に関連する抗原を認識する抗体であることが好ましい。

【 0 0 6 5 】

具体的には、腫瘍関連抗原を認識する抗体が抗 G D 2 抗体 (Ohta et al., *Anticancer Res.*, 13, 331-336, 1993)、抗 G D 3 抗体 (Ohta et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 36, 260-266, 1993)、抗 G M 2 抗体 (Nakamura et al., *Cancer Res.*, 54, 1511-1516, 1994)、抗 H E R 2 抗体 (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4285-4289, 1992)、抗 C D 5 2 抗体 (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4285-4289, 1992)、抗 M A G E 抗体 (Jungbluth et al., *British J. Cancer*, 83, 493-497, 2000)、抗 H M 1 . 2 4 抗体 (Ono et al., *Molecular Immunol.*, 36, 387-395, 1999)、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) 抗体 (Ogata et al., *Cancer*, 88, 2909-2911, 2000)、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗 F G F 8 抗体 (Matsuzaki et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 9911-9915, 1989)、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗 F G F 8 受容体抗体 (Kuo et al., *J. Biol. Chem.*, 265, 16455-16463, 1990)、抗インスリン様増殖因子抗体 (Yao et al., *J. Neurosci. Res.*, 40, 647-659, 1995)、抗 IGF 受容体抗体 (Yao et al., *J. Neurosci. Res.*, 40, 647-659, 1995)、抗 P M S A 抗体 (Murphy et al., *J. Urology*, 160, 2396-2401, 1998)、抗血管内皮細胞増殖因子抗体 (Presta et al., *Cancer Res.*, 57, 4593-4599, 1997) または抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体 (Kanno et al., *Oncogene*, 19, 2138-2146, 2000) であり、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体が抗インターロイキン 6 抗体 (Abrams et al., *Immunol. Rev.*, 127, 5-24, 1992)、抗インターロイキン 6 受容体抗体 (Sato et al., *Molecular Immunol.*, 31, 371-381, 1994)、抗インターロイキン 5 抗体 (Abrams et al., *Immunol. Rev.*, 127, 5-24, 1992)、抗インターロイキン 5 受容体抗体、抗インターロイキン 4 抗体 (Bird et al., *Cytokine*, 3, 562-567, 1991)、抗インターロイキン 4 受容体抗体 (Jung et al., *J. Immunol. Meth.*, 217, 41-50, 1998)、抗腫瘍壊死因子抗体 (Tempest et al., *Hybridoma*, 13, 183-190, 1994)、抗腫瘍壊死因子受容体抗体 (Amrani et al., *Molecular Pharmacol.*, 58, 237-245, 2000)、抗 C C R 4 抗体 (Campbell et al., *Nature*, 400, 776-78



0, 1999)、抗ケモカイン抗体 (Peri et al., J. Immunol. Meth., 174, 249-257, 1994) または抗ケモカイン受容体抗体 (Wu et al., J. Exp. Med., 186, 1373-1381, 1997) であり、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗 G p I I b / I I I a 抗体 (Co et al., J. Immunol., 152, 2968-2976, 1994)、抗血小板由来増殖因子抗体 (Ferns et al., Science, 253, 1129-1132, 1991)、抗血小板由来増殖因子受容体抗体 (Shulman et al., J. Biol. Chem., 272, 17400-17404, 1997) または抗血液凝固因子抗体 (Peter et al., Circulation, 101, 1158-1164, 2000) であり、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗自己 DNA 抗体 (Brosh et al., Immunol. Letters, 72, 61-68, 2000) であり、ウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体が抗 g p 1 2 0 抗体 (Tugarinov et al., Structure, 8, 385-395, 2000)、抗 C D 4 抗体 (Schulze-Koops et al., J. Rheumatology, 25, 2065-2076, 1998)、抗 C C R 4 抗体または抗ペロ毒素抗体 (Karmali et al., J. Clin. Microbiol., 37, 396-399, 1999) である。

また、上記抗体は、A T C C (The American Type Culture Collection)、理化学研究所細胞開発銀行、工業技術院生命工業技術研究所等の公的な機関、あるいは大日本製薬株式会社、R&D SYSTEMS社、PharMingen社、コスモバイオ社、フナコシ株式会社等の民間試薬販売会社からも入手することができる。

#### 【 0 0 6 6 】

本発明において、免疫機能分子のエフェクター機能とは、F c 領域を介した細胞障害活性 (A D C C 活性) および／または補体依存性細胞障害活性 (C D C 活性) を意味する。

F c 領域を介した細胞障害活性とは、腫瘍細胞等に結合した抗体が、抗体Fc領域とキラー細胞、ナチュラルキラー細胞、活性化されたマクロファージ等のエフェクター細胞表面上に存在するFcレセプターの結合を介してエフェクター細胞を活性化し、腫瘍細胞等を障害する活性を意味する [モノクローナル・アンティボディズ: プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 2.1 (1995)] 。

#### 【 0 0 6 7 】

上記免疫機能分子としてのタンパク質あるいはペプチドとしては、種々の免疫反応を活性化できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、インターフェロン分子であるインターロイキン-2 (IL-2) [サイエンス(Science), 193, 1007 (1976)]、インターロイキン-12 (IL-12) [ジャーナル・オブ・ロイコサイト・バイオロジー(J. Leuc. Biol.), 55, 280 (1994)]、コロニー刺激因子である顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) [ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 258, 9017 (1983)]、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) [ジャーナル・オブ・エクスperimental・メディシン(J. Exp. Med.), 173, 269 (1992)]、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) [ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 252, 1998 (1977)]、増殖因子であるエリスロポイエチン (EPO) [ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 252, 5558 (1977)]、トロンボポイエチン (TPO) [ネイチャー(Nature), 369, 533 (1994)] などがあげられる。

#### 【 0 0 6 8 】

上記タンパク質又はペプチドの活性とは、該糖鎖を有するタンパク質およびペプチドを生体内に投与した際の、リンパ球 (T細胞、B細胞等)、マクロファージ等をはじめとする各種免疫担当細胞の活性、または種々の免疫応答反応を意味する。

本発明のタンパク質又はペプチドの活性の亢進とは、IL-2やIL-12によるNK細胞、T細胞の活性化、EPOによる赤血球産生の促進作用等がさらに増強されることを意味する。

本発明の細胞種としては、免疫機能分子を発現できる細胞種であればいかなる細胞も包含する。その例として、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などが挙げられる。これらの細胞の具体例としては、後述の3. に記載のものが挙げられる。特に、動物細胞の中でも、チャイニーズハムスター卵巣組織由来CHO細胞、ラットミエローマ細胞株YB 2 / 3 HL. P 2. G 1 1. 1 6 Ag. 2 0 細胞、マウスミエローマ細胞株NS 0 細胞、マウスミエローマ細胞株SP 2 / 0 - Ag 1 4 細胞、シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞、抗体を産生す

るハイブリドーマ細胞、ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞などが好ましい。

#### 【0069】

本発明において、シンテニーとは、異種間において染色体上で保存されているゲノム遺伝子領域を意味する。すなわち、生物間には、進化の過程で、異なった生物種の間で遺伝子配列が保存されたままの領域がゲノム中にモザイク状に存在することが知られており、その部分をシンテニーという。シンテニーについては、The Dysmorphic Human-Mouse Homology Database (GHMHD, <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/DHMH/dysmorph.html>) あるいは National Center for Biotechnology Information (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Homology>) で調べることができる。

#### 【0070】

本発明において、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、例えば配列番号1、2または3で表される塩基配列を有するDNAなどのDNAまたはその一部の断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0Mの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989（以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す）、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号

1、2または3で表される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

上記DNAを含むターゲットベクターの説明については、後述の1. (4) (b) に記載の説明に準ずる。

#### 【0071】

以下、本発明を詳細に説明する。

##### 1. 本発明の細胞の作製

本発明の、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が人為的手法により制御された細胞は、1) 細胞を培養している培地への糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性の阻害剤又は活性化剤の添加、2) 突然変異体の選択、3) 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子の導入、4) 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子の破壊、(5) 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子の転写又は翻訳の抑制などの人為的手法を親株の細胞に施すことで、作製できる。以下にその具体的に説明する。

#### 【0072】

(1) 培地への酵素阻害剤又は活性化剤の添加による、本発明の細胞の作製

糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性の阻害剤又は活性化剤を添加した培地を用いて細胞を培養することで、本発明の細胞を作製することができる。

糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性の阻害剤又は活性化剤を添加した培地を用いて細胞を培養することで、本発明の宿主細胞を作製することができる。

本発明の宿主細胞を作製するために添加する酵素阻害剤又は活性化剤とは、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性を変化させる化合物であれば、いずれの化合物も阻害剤又は活性化剤として用いることができる。糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性を変化させる化合物としては、例えば、ツニカマイシン、カスパトスペルミン、N-メチル-1-デオキシノジリマイシン、プロモコンヅリトール、1-デオキシノジリマイシン、1、4-ジオキシー-1、4-イ

ミノ-D-マンニトール、スワンソニン、1-デオキシノジリマイシンなどの酵素活性の阻害剤が挙げられる。また、糖鎖の修飾に係わる酵素の基質のデオキシ誘導体も酵素活性に影響を与えることが知られており、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性を変化させる化合物として挙げるができる。さらに、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素遺伝子の転写を調節する転写活性化剤や抑制剤なども糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性を変化させる化合物として挙げるができる。これら糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の阻害剤又は活性化剤は単独で培地に添加してもよいし、複数の化合物を組み合わせで宿主細胞を培養する培地へ添加してもよい。

### 【0073】

#### (2) 突然変異体の選択による、本発明の細胞の作製

突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体の中から、所望の細胞株を選択する方法としては、以下の方法があげられる。突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、糖タンパク質の糖鎖の修飾に関わる酵素の活性を指標として、所望の細胞株を選択する方法、突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から生産された糖タンパク質の糖鎖構造を指標に、所望の細胞株を選択する方法などがあげられる。

突然変異誘発処理としては、親株の細胞のDNAに点突然変異、欠失あるいはフレームシフト突然変異を誘起するものであればいかなる処理も用いることができる。具体的には、エチルニトロソウレア、ニトロソグアニジン、ベンゾピレン、アクリジン色素による処理、放射線の照射などが挙げられる。また、種々のアルキル化剤や発癌物質も突然変異誘発物質として用いることができる。突然変異誘発物質を細胞に作用させる方法としては、例えば、組織培養の技術 第三版（朝倉書店）日本組織培養学会編(1996)、ネイチャー・ジェネティクス(Nature Genet.), 24, 314, (2000)等に記載の方法を挙げるができる。

自然発生的に生じた突然変異体としては、特別な突然変異誘発処理を施さないで、通常の細胞培養の条件で継代培養を続けることによって自然発生的に生じる突然変異体を挙げるができる。

## 【 0 0 7 4 】

糖タンパク質の修飾に係わる酵素の活性を選択測定する方法としては、例えば、後述の 7. に記載の生化学的な方法や遺伝子工学的な方法が挙げられる。糖タンパク質の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、3 に記載の糖鎖分析の方法や、ソマティック・セル・アンド・モレキュラー・ジェネティクス (Somatic Cell Mol. Genet.) , 12, 51, (1986) 等に記載のレクチンを用いた方法が挙げられる。レクチンとしては、例えば、WGA(T. vulgaris由来のwheat-germ agglutinin)、ConA(C. ensiformis由来のconcanavalin A)、RIC(R. communis由来の毒素)、L-PHA(P. vulgaris由来のleukoagglutinin)、LCA(L. culinaris由来のlentil agglutinin)、PSA(P. sativum由来のPea lectin)、AAL(Aleuria aurantia Lectin)、ACL(Amaranthus caudatus Lectin)、BPL(Bauhinia purpurea Lectin)、DSL(Datura stramonium Lectin)、DBA(Dolichos biflorus Agglutinin)、EBL(Elderberry Bark Lectin)、ECL(Erythrina cristagalli Lectin)、EEL(Euonymus europaeus Lectin)、GNL(Galanthus nivalis Lectin)、GSL(Griffonia simplicifolia Lectin)、HPA(Helix pomatia Agglutinin)、HHL(Hippeastrum Hybrid Lectin)、Jacalin、LTL(Lotus tetragonolobus Lectin)、LEL(Lycopersicon esculentum Lectin)、MAL(Maackia amurensis Lectin)、MPL(Maclura pomifera Lectin)、NPL(Narcissus pseudonarcissus Lectin)、PNA(Peanut Agglutinin)、E-PHA(Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin)、PTL(Psophocarpus tetragonolobus Lectin)、RCA(Ricinus communis Agglutinin)、STL(Solanum tuberosum Lectin)、SJA(Sophora japonica Agglutinin)、SBA(Soybean Agglutinin)、UEA(Ulex europaeus Agglutinin)、VVL(Vicia villosa Lectin)、WFA(Wisteria floribunda Agglutinin)が挙げられる。

## 【 0 0 7 5 】

(3) 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子の導入による、本発明の細胞の作製

本発明の細胞は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版等に記載された遺伝子導入の方法を用い、例えば、以下のように作製

することができる。

#### 【0076】

糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の cDNA を調製する。

調製した糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の全長 cDNA をもとにして、必要に応じて、該タンパク質をコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。

該 DNA 断片、または全長 cDNA を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、形質転換体を得る。

導入した糖タンパク質の修飾に係わる酵素の活性あるいは糖タンパク質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の宿主細胞を得ることができる。

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。具体的には、1 に記載の宿主細胞が挙げられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、目的とする糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素をコードする DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述の 3. に記載の発現ベクターが挙げられる。

#### 【0077】

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の 3. に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

導入した糖タンパク質の修飾に係わる酵素の活性あるいは糖タンパク質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択する方法としては、例えば、1 の (2) に記載の方法が挙げられる。

糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の cDNA は、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から、例えば以下のように調製することができる。

ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から全 RNA 又は mRNA を調製する。

調製した全RNA又はmRNAからcDNAライブラリーを作製する。

#### 【0078】

糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素のアミノ酸配列に基づいて、デジェネレイティブプライマーを作製し、作製したcDNAライブラリーを鋳型としてPCR法にて糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素をコードする遺伝子断片を取得する。

取得した遺伝子断片をプローブとして用い、cDNAライブラリーをスクリーニングし糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素をコードするDNAを取得することができる。

#### 【0079】

ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞のmRNAは市販のもの(例えばClontech社)を用いてもよいし、以下のごとくヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から調製してもよい。ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法[メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 154, 3 (1987)]、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム(AGPC)法[アナリティカル・バイオケミストリー(Analytical Biochemistry), 162, 156 (1987); 実験医学, 9, 1937 (1991)]などがあげられる。

#### 【0080】

また、全RNAからpoly(A)+RNAとしてmRNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法(モレキュラー・クローニング第2版)等があげられる。

さらに、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社)などのキットを用いることによりmRNAを調製することができる。

調製したヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞mRNAからcDNAライブラリーを作製する。cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、A Laboratory Manual, 2nd Ed. (1989)等に記載された方法、あるいは市販のキ



ット、例えばSuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (Life Technologies社)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE社) を用いる方法などがあげられる。

#### 【 0 0 8 1 】

c DNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [STRATAGENE社、ストラテジーズ(Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (STRATAGENE社)、λgt10、λgt11 [ディーエヌエー・クローニング・ア・プラクティカル・アプローチ(DNA cloning, A Practical Approach), 1, 49 (1985)]、λTriplEx (Clontech社)、λExCell (Pharmacia社)、pT7T318U (Pharmacia社)、pcD2 [モレキュラー・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] およびpUC18 [ジーン(Gene), 33, 103 (1985)] 等をあげることができる。

#### 【 0 0 8 2 】

宿主微生物としては、微生物であればいずれでも用いることができるが、好ましくは大腸菌が用いられる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF' [STRATAGENE社、ストラテジーズ(Strategies), 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [ジェネティクス(Genetics), 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] およびEscherichia coli JM105 [ジーン(Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

#### 【 0 0 8 3 】

このc DNAライブラリーを、そのまま以降の解析に用いてもよいが、不完全長c DNAの割合を下げ、なるべく完全長c DNAを効率よく取得するために、

菅野らが開発したオリゴキャップ法 [ジーン(Gene), 138, 171 (1994); ジーン(Gene), 200, 149 (1997); 蛋白質核酸酵素, 41, 603 (1996); 実験医学, 11, 2491 (1993); cDNAクローニング(羊土社)(1996); 遺伝子ライブラリーの作製法(羊土社)(1994)] を用いて調製したcDNAライブラリーを以下の解析に用いてもよい。

#### 【0084】

糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素のアミノ酸配列に基づいて、該アミノ酸配列をコードすることが予測される塩基配列の5'端および3'端の塩基配列に特異的なデジェネレイティブプライマーを作製し、作製したcDNAライブラリーを鋳型としてPCR法 [ピーシーアール・プロトコールズ(PCR Protocols), Academic Press (1990)] を用いてDNAの増幅を行うことにより糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素をコードする遺伝子断片を取得することができる。

#### 【0085】

取得した遺伝子断片が糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素をコードするDNAであることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいはABI PRISM 377 DNAシーケンサー (PE Biosystems社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

該遺伝子断片をDNAをプローブとして、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリー対してコロニーハイブリダイゼーションやプラークハイブリダイゼーション (モレキュラー・クローニング第2版) を行うことにより、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素のDNAを取得することができる。

#### 【0086】

また、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素をコードする遺伝子断片を取得するために用いたプライマーを用い、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリーを鋳型として、PCR法を用いてスクリーニングを行うことにより、糖タンパク質の糖鎖の修

飾に係わる酵素のDNAを取得することもできる。

取得した糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素のDNAの塩基配列を末端から、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいはABI PRISM 377 DNA シークエンサー (PE Biosystems社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定する。

#### 【0087】

決定したcDNAの塩基配列をもとに、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBLおよびDDBJなどの塩基配列データベースを検索することにより、データベース中の遺伝子の中で糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素をコードしている遺伝子を決定することもできる。

上記の方法で得られる糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素をコードしている遺伝子の塩基配列として、例えば配列番号1または2に記載の塩基配列が挙げられる。

決定されたDNAの塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社のDNA合成機model 392等のDNA合成機で化学合成することにより、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素のcDNAを取得することもできる。

#### 【0088】

(4) 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素遺伝子の破壊による、本発明の細胞の作製

本発明の細胞は、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子を標的とし、遺伝子破壊の方法を用いることにより作製することができる。ここでいう遺伝子とは、DNAまたはRNAを含む。

遺伝子破壊の方法としては、標的とする糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子を破壊することができる方法であればいかなる方法も包含される。その例としては、アンチセンス法、リボザイム法、相同組換え法、RDO法、RNAi法、レトロウイルスを用いた方法、トランスポゾンを用いた方法等が挙げら

れる。以下これらを具体的に説明する。

(a) アンチセンス法又はリボザイム法による本発明の細胞の作製

本発明の細胞は、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素遺伝子を標的とし、細胞工学, 12, 239, (1993)、バイオ／テクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 17, 1097, (1999)、ヒューマン・モレキュラー・ジェネティクス(Hum. Mol. Genet.), 5, 1083, (1995)、細胞工学, 13, 255, (1994)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 96, 1886 (1999)等に記載されたりボザイム法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

#### 【0089】

糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の cDNA あるいはゲノム DNA を調製する。

調製した cDNA あるいはゲノム DNA の配列を決定する。

決定した DNA の配列に基づき、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素をコードする部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのアンチセンス遺伝子またはリボザイムのコンストラクトを設計する。

該アンチセンス遺伝子、またはリボザイムを細胞内で発現させるために、調製した DNA の断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

導入した糖タンパク質の修飾に係わる酵素の活性あるいは糖タンパク質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の宿主細胞を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3. に記載の宿主細胞が挙げられる。

#### 【0090】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なものは染色体中

への組み込みが可能で、設計したアンチセンス遺伝子、またはリボザイムを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述の 3. に記載の発現ベクターが挙げられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の 3. に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

導入した糖タンパク質の修飾に係わる酵素の活性あるいは糖タンパク質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択する方法としては、例えば、1 の (2) に記載の方法が挙げられる。

#### 【0091】

糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の cDNA を調製する方法としては、例えば、1 の (3) に記載の方法が挙げられる。

糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素のゲノム DNA を調製する方法としては、例えば、1 の (4) の (b) に記載の方法が挙げられる。

また、発現ベクターを用いず、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の塩基配列に基づいて設計したアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを、直接宿主細胞に導入することで、本発明の宿主細胞を得ることもできる。

#### 【0092】

アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムは、常法または DNA 合成機を用いることにより調製することができる。具体的には、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の cDNA およびゲノム DNA の塩基配列のうち、連続した 5 ～ 150 塩基、好ましくは 5 ～ 60 塩基、より好ましくは 10 ～ 40 塩基に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドの配列情報に基づき、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド）または該オリゴヌクレオチドの配列を含むリボザイムを合成することで調製することができる。

#### 【0093】

オリゴヌクレオチドとしては、オリゴ RNA および該オリゴヌクレオチドの誘導体（以下、誘導体オリゴヌクレオチドという）等があげられる。

誘導体オリゴヌクレオチドとしては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステ

ル結合がホスフォロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine)で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチド等があげられる [細胞工学, 16, 1463 (1997)]。

#### 【0094】

##### (b) 相同組換え法による本発明の細胞の作製

本発明の細胞は、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子を標的とし、染色体上の標的遺伝子を相同組換え法を用い改変することによって作製することができる。

染色体上の標的遺伝子の改変は、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載の方法を用い、例えば以下のように行なうことができる。

#### 【0095】

糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素のゲノムDNAを調製する。

該ゲノムDNAの塩基配列にも基づき、改変する標的遺伝子(例えば、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の構造遺伝子、あるいはプロモーター遺伝子)を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。

作製したターゲットベクターを宿主細胞に導入し、標的遺伝子とターゲットベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、本発明の細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3. に記載の宿主細胞が挙げられる。

#### 【0096】

糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素のゲノム DNA を調製する方法としては、モレキュラー・クローニング第 2 版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された公知の方法があげられる。また、ゲノム DNA ライブラリースクリーニングシステム (Genome Systems 社) や Universal GenomeWalker™ Kits (CLONTECH 社) などを用いることにより、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素のゲノム DNA を単離することもできる。

上記の方法で得られる糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 3 に記載の塩基配列が挙げられる。

標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲッティング, ES 細胞を用いた変異マウスの作製 (羊土社) (1995) 等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲットベクターは、リプレースメント型、インサクション型いずれでも用いることができる。

#### 【0097】

各種宿主細胞へのターゲットベクターの導入には、後述の 3. に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲッティング, ES 細胞を用いた変異マウスの作製 (羊土社) (1995) 等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリ A 選択などの方法を用いることができる。選別した細胞株の中から目

的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーション法（モレキュラー・クローニング第2版）やPCR法［ピーシーアール・プロトコールズ(PCR Protocols), Academic Press (1990)] 等が挙げられる。

#### 【0098】

(c) RDO方法による本発明の細胞の作製

本発明の細胞は、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子を標的とし、RDO (RNA-DNA oligonucleotide) 法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素のcDNAあるいはゲノムDNAを調製する。

調製したcDNAあるいはゲノムDNAの塩基配列を決定する。

決定したDNAの配列に基づき、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素をコードする部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのRDOのコンストラクトを設計し合成する。

合成したRDOを宿主細胞に導入し、標的とした糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子に変異が生じた形質転換体を選択することにより、本発明の宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の3. に記載の宿主細胞が挙げられる。各種宿主細胞へのRDOの導入には、後述の3. に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素のcDNAを調製する方法としては、例えば、1の(3)に記載の方法が挙げられる。

#### 【0099】

糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、例えば、1の(4)の(b)に記載の方法が挙げられる。

DNAの塩基配列を決定する方法としては、6に記載の方法が挙げられる。



RDOは、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。

RDOを宿主細胞に導入し、標的とした糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子に変異が生じた細胞を選択する方法としては、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された染色体上の遺伝子の変異を直接検出する方法が挙げられる。また、1の(2)に記載の、導入した糖タンパク質の修飾に係わる酵素の活性あるいは糖タンパク質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択する方法も用いることができる。

#### 【0100】

RDOのコンストラクトは、サイエンス(Science), 273, 1386, (1996); ネイチャー・メディシン(Nature Medicine), 4, 285, (1998); ヘパトロジー(Hepatology), 25, 1462, (1997); ジーン・セラピー(Gene Therapy), 5, 1960, (1999); ジーン・セラピー(Gene Therapy), 5, 1960, (1999); ジャーナル・オブ・モレキュラー・メディシン(J. Mol. Med.), 75, 829, (1997); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8774, (1999); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8768, (1999); ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nuc. Acids. Res.), 27, 1323, (1999); インベステイゲーション・オブ・ダーマトロジー(Invest. Dermatol.), 111, 1172, (1998); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 16, 1343, (1998); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 18, 43, (2000); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 18, 555, (2000)等の記載に従って設計することができる。

#### 【0101】

(d) RNAi方法による本発明の宿主細胞の作製

本発明の宿主細胞は、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子を標的とし、RNAi (RNA interference) 法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素のcDNAを調製する。

調製した cDNA の塩基配列を決定する。

決定した DNA の配列に基づき、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素をコードする部分あるいは非翻訳領域の部分を含む適当な長さの RNA i 遺伝子のコンストラクトを設計する。

該 RNA i 遺伝子を細胞内で発現させるために、調製した DNA の断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

導入した糖タンパク質の修飾に係わる酵素の活性あるいは糖タンパク質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の宿主細胞を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3. に記載の宿主細胞が挙げられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、設計した RNA i 遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述の 3. に記載の発現ベクターが挙げられる。

### 【0102】

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の 3. に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

糖タンパク質の修飾に係わる酵素の活性あるいは糖タンパク質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択する方法としては、例えば、1 の (2) に記載の方法が挙げられる。

糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の cDNA を調製する方法としては、例えば、1 の (3) に記載の方法が挙げられる。

また、発現ベクターを用いず、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の塩基配列に基づいて設計した RNA i 遺伝子を、直接宿主細胞に導入することで、本

発明の宿主細胞を得ることもできる。

RNAi 遺伝子は、常法または DNA 合成機を用いることにより調製することができる。

#### 【0103】

RNAi 遺伝子のコンストラクトは、[ネイチャー(Nature), 391, 806, (1998)]; プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 95, 15502, (1998); ネイチャー(Nature), 395, 854, (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 5049, (1999); セル(Cell), 95, 1017, (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 1451, (1999); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 95, 13959, (1998); ネイチャー・セル・バイオオロジー(Nature Cell Biol.), 2, 70, (2000)]等の記載に従って設計することができる。

#### 【0104】

(e) トランスポゾンを用いた方法による、本発明の細胞の作製

本発明の細胞は、ネイチャー・ジェネティク(Nature Genet.), 25, 35, (2000)等に記載のトランスポゾンのシステムを用い、糖タンパク質の修飾に係わる酵素の活性あるいは糖タンパク質の糖鎖構造を指標に突然変異体を選択することで、本発明の宿主細胞を作製することができる。

トランスポゾンのシステムとは、外来遺伝子をランダムに染色体上に挿入させることで突然変異を誘発させるシステムであり、通常、トランスポゾンに挿入された外来遺伝子を突然変異を誘発させるベクターとして用い、この遺伝子を染色体上にランダムに挿入させるためのトランスポゼースの発現ベクターを同時に細胞の中に導入する。

#### 【0105】

トランスポゼースは、用いるトランスポゾンの配列に適したものであればいかなるものも用いることができる。

外来遺伝子としては、宿主細胞の DNA に変異を誘起するものであればいかな

る遺伝子も用いることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3. に記載の宿主細胞が挙げられる。各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の 3. に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

糖タンパク質の修飾に係わる酵素の活性あるいは糖タンパク質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択する方法としては、例えば、1 の (2) に記載の方法が挙げられる。

#### 【0106】

(5) 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する方法。

本発明の細胞は、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子を標的とし、アンチセンス RNA/DNA 技術 [バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)]、トリプル・ヘリックス技術 [Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)] 等を用い、標的とする遺伝子の転写または翻訳を抑制することで作製することができる。

#### 【0107】

2. 本発明の、トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫の作製

本発明の、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が制御されるようにゲノム遺伝子が改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫は、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の遺伝子を標的として、1 に記載の手法を用いて作製した本発明の胚性幹細胞、受精卵細胞、植物カルス細胞より、例えば以下のように作製することができる。

#### 【0108】

トランスジェニック非ヒト動物の場合、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、

ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル、ウサギ等の胚性幹細胞に、1に記載の手法を施すことで糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が制御された本発明の胚性幹細胞を作製する。具体例としては、染色体上の糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素をコードする遺伝子を公知の相同組換えの手法[例えば、Nature, 326, 6110, 295 (1987)、Cell, 51, 3, 503 (1987)等]により不活化または任意の配列と置換した変異クローンなどが挙げられる。作製した胚性幹細胞(例えば、該変異クローン)を用い、動物の受精卵の胚盤胞(blastocyst)への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により、胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を調製することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞で糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が制御されたトランスジェニック非ヒト動物を得ることができる。

#### 【0109】

また、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル、ウサギ等の受精卵細胞に、1に記載の手法を施すことで糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が制御された本発明の受精卵細胞を作製する。作製した受精卵細胞を、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版等に記載の胚移植の方法を用いて偽妊娠雌の卵管あるいは子宮に移植し出産させることで、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が制御されたトランスジェニック非ヒト動物を作製することもできる。

#### 【0110】

トランスジェニック植物の場合、目的とする植物体カルス又は細胞に、1に記載の手法を施すことで糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が制御された本発明のカルスを作製する。作製したカルスを、公知の方法[組織培養, 20 (1994); 組織培養, 21 (1995); トレンド・イン・バイオテクノロジー(Trends in Biotechnology), 15, 45 (1997)]に準じてオーキシン及びサイトカイニンを含む培地で培養することで再分化させ、糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が制御されたトランスジェニック植物を作製することができる。

#### 【0111】

### 3. 各種細胞での発現させた免疫機能分子の取得

免疫機能分子は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988（以下、アンチボディズと略す）、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press, 1993（以下、モノクローナルアンチボディズと略す）、Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996（以下、アンチボディエンジニアリングと略す）等に記載された方法を用い、例えば、以下のように宿主細胞中で発現させて取得することができる。

#### 【0 1 1 2】

免疫機能分子の cDNA を調製し、必要に応じて調製した免疫機能分子の全長 cDNA をもとにして、該タンパク質をコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。

該 DNA 断片、または全長 cDNA を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、タンパク質を生産する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

#### 【0 1 1 3】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないは染色体中への組込が可能で、目的とする免疫機能分子をコードする DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

cDNA は、1 の（3）に記載の方法に従い、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞より、目的とする免疫機能分子に特異的なプローブプライマー等を用いて調製することができる。

#### 【0 1 1 4】

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、目的とする免疫機能分子をコードする DNA を含有してなる組換えベクターは原核生物中で自立複製可能で

あると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、目的とする免疫機能分子をコードする遺伝子、転写終結配列、より構成されたベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

#### 【 0 1 1 5 】

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（Pharmacia社）、pSE280（Invitrogen社）、pGEMEX-1（Promega社）、pQE-8（QIAGEN社）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-)（Stratagene社）、pTrs30 [Escherichia coli JM109/pTrS30 (FERM BP-5407) より調製]、pTrs32 [Escherichia coli JM109/pTrS32 (FERM BP-5408) より調製]、pGHA2 [Escherichia coli IGH A2 (FERM B-400) より調製、特開昭60-221091]、pGKA2 [Escherichia coli IGH A2 (FERM BP-6798) より調製、特開昭60-221091]、pTerm2 (US4686191、US4939 094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX (Pharmacia社)、pETシステム (Novagen社)、pSupex等をあげることができる。

プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (P<sub>trp</sub>)、lacプロモーター、P<sub>L</sub>プロモーター、P<sub>R</sub>プロモーター、T7プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターをあげることができる。またP<sub>trp</sub>を2つ直列させたプロモーター (P<sub>trp</sub>×2)、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

#### 【 0 1 1 6 】

リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6～18塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

目的とする免疫機能分子をコードする部分の塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換することにより、目的とするタンパク質の生産

率を向上させることができる。

目的とする免疫機能分子の組換えベクターにおいては、目的とする免疫機能分子をコードするDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

#### 【0117】

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY 3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli H B101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli N Y49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Brevibacterium flavum ATCC14067、Brevibacterium lactofermentum ATCC13869、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-01 10等をあげることができる。

#### 【0118】

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法〔プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法〔特開昭63-248 3942]、またはジーン(Gene), 17, 107 (1982)やモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス(Molecular & General Genetics), 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげるすることができる。

#### 【0119】

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)等をあげることで



きる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF $\alpha$ 1プロモーター、CUP 1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリュイベロミセス属、トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius等をあげることができる。

#### 【0120】

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [メソッズ・エンザイモロジー (Methods. Enzymol.), 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A), 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J. Bacteriology), 153, 163 (1983)]、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A), 75, 1929 (1978)] に記載の方法等をあげることができる。

#### 【0121】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p c DNA I、p c DM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平3-22979; サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133, (1990)]、pAS3-3 [特開平2-227075]、pCDM8 [ネイチャー (Nature), 329, 840, (1987)]、p c DNA I/Amp (Invitrogen社)、pREP4 (Invitrogen社)、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochemistry), 101, 1307 (1987)]、pAGE210等をあげることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) の IE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター等をあげることができる。また、ヒト CMV の IE 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

### 【0 1 2 2】

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞、HBT5637 (特開昭63-299)、ラットミエローマ細胞、マウスミエローマ細胞、シリアンハムスター腎臓由来細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 [特開平2-27075]、リポフェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)]、インジェクション法 [Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) (以下、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版と略す)]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 [特許第2606856、特許第2517813]、DEAE-デキストラン法 [バイオマニュアルシリーズ4—遺伝子導入と発現・解析法 (羊土社) 横田崇・新井賢一編(1994)]、ウイルスベクター法 [マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版]等をあげることができる。

### 【0 1 2 3】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー-Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII（ともにInvitrogen社）等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

#### 【0124】

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21 [カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーBaculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHigh 5 (Invitrogen社)等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

#### 【0125】

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

#### 【0126】

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) [特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977]、エレクトロポレーション法 [特開昭60-251887]、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法 [日本特許第2606856、日本特許第2517813] 等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行うことができる。

#### 【0 1 2 7】

糖鎖の合成に参与する遺伝子を導入した細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたタンパク質を得ることができる。

#### 【0 1 2 8】

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に目的とする免疫機能分子を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、目的とする免疫機能分子を製造することができる。形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

#### 【0 1 2 9】

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンス

チープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

### 【0130】

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中のpHは3.0～9.0に保持する。pHの調製は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

### 【0131】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [ザ・ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association), 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [サイエンス(Science), 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地 [ヴェウロロジー(Virology), 8, 396 (1959)]、199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォア・ザ・バイオロジカル・メディスン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1 (1950)]、Whitten培地[発生工学実験マニュアル-トランスジェニック・マウスの作り方(講談社)勝木元也編(1987)]またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

## 【0 1 3 2】

培養は、通常 pH 6 ~ 8、3 0 ~ 4 0 °C、5 %CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で 1 ~ 7 日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地（Pharmingen社）、Sf-900 II SFM培地（Life Technologies社）、ExCell400、ExCell405（いずれもJRH Biosciences社）、Grace's Insect Medium [ネイチャー(Nature), 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

培養は、通常 pH 6 ~ 7、2 5 ~ 3 0 °C等の条件下で、1 ~ 5 日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

## 【0 1 3 3】

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ(MS)培地、ホワイト(White)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常 pH 5 ~ 9、2 0 ~ 4 0 °Cの条件下で 3 ~ 6 0 日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

## 【0 1 3 4】

上記のとおり、目的とする免疫機能分子をコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該タンパク質を生成蓄積させ、該培養物より該タンパク質を採取することにより、該タンパク質を製造することができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行う

ことができる。

目的とする免疫機能分子の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるタンパク質の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

#### 【0135】

目的とする免疫機能分子が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 86, 8227 (1989); ジーン・デベロップメント (Genes Develop.), 4, 1288 (1990)]、または特開平05-336963、特開平06-823021等に記載の方法を準用することにより、該タンパク質を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、目的とする免疫機能分子の手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、目的とする免疫機能分子を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体（トランスジェニック非ヒト動物）または植物個体（トランスジェニック植物）を造成し、これらの個体を用いて目的とする免疫機能分子を製造することもできる。

#### 【0136】

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該タンパク質を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該タンパク質を採取することにより、該タンパク質を製造することができる。

動物個体を用いて目的とする免疫機能分子を製造する方法としては、例えば公知の方法 [アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション (American Journal of Clinical Nutrition), 63, 639S (1996); アメリカン・ジャ

ーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション(American Journal of Clinical Nutrition), 63, 627S (1996); バイオ／テクノロジー(Bio/Technology), 9, 830 (1991)] に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に目的とする免疫機能分子を生産する方法があげられる。

#### 【0137】

動物個体の場合は、例えば、目的とする免疫機能分子をコードするDNAを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、該タンパク質を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該タンパク質を採取することにより、該タンパク質を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭63-309192）、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである $\alpha$ カゼインプロモーター、 $\beta$ カゼインプロモーター、 $\beta$ ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

#### 【0138】

植物個体を用いて目的とする免疫機能分子を製造する方法としては、例えば目的とする免疫機能分子をコードするDNAを導入したトランスジェニック植物を公知の方法〔組織培養, 20 (1994); 組織培養, 21 (1995); トレンド・イン・バイオテクノロジー(Trends in Biotechnology), 15, 45 (1997)] に準じて栽培し、該タンパク質を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該タンパク質を採取することにより、該タンパク質を生産する方法があげられる。

#### 【0139】

目的とする免疫機能分子をコードする遺伝子を導入した形質転換体により製造されたタンパク質は、例えば目的とする免疫機能分子が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル



(DEAE)－セファロース、DIAION HPA-75（三菱化学（株）製）等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF（Pharmacia社）等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

#### 【0140】

また、該タンパク質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分としてタンパク質の不溶体を回収する。回収したタンパク質の不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該タンパク質を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該タンパク質の精製標品を得ることができる。

目的とする免疫機能分子あるいはその各種糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該タンパク質あるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

このようにして取得されるタンパク質として、例えば、抗体、抗体の断片、抗体のFc領域を有する融合タンパク質やペプチドをあげることができる。

#### 【0141】

以下に、より具体的な免疫機能分子の取得の例として、ヒト化抗体の取得について記すが、他の免疫機能分子を上述の方法および当該方法に準じて取得することもできる。

##### （1）ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体の重鎖（H鎖）及び軽鎖（L鎖）C領域をコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子をそれぞれ

クローニングすることにより構築することができる。

ヒト抗体のC領域としては、任意のヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域であることができ、例えば、ヒト抗体のH鎖のIgG1サブクラスのC領域（以下、hC $\gamma$ 1と表記する）及びヒト抗体のL鎖の $\kappa$ クラスのC領域（以下、hC $\kappa$ と表記する）等があげられる。

#### 【0142】

ヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成る染色体DNAを用いることができ、また、cDNAを用いることもできる。

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン(Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 78, 1527 (1981)]、pSG1 $\beta$ d2-4 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 4, 173 (1990)]等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスのLTR [バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem. Biophys. Res. Commun.), 149, 960 (1987)]、免疫グロブリンH鎖のプロモーター [セル(Cell), 41, 479 (1985)]とエンハンサー [セル(Cell), 33, 717 (1983)]等があげられる。

#### 【0143】

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体H鎖及びL鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ（以下、タンデム型と表記する）のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体H鎖及びL鎖の発現量のバランスが均衡する等の点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ(J. Immunol. Methods), 167, 2

71 (1994)]。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体及びヒト型CDR移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

#### 【0144】

(2) ヒト以外の動物の抗体のV領域をコードするcDNAの取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAは以下のようにして取得することができる。

目的のマウス抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAをファージ或いはプラスミド等のベクターにクローニングしてcDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、既存のマウス抗体のC領域部分或いはV領域部分をプローブとして用い、H鎖V領域をコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミド及びL鎖V領域をコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的のマウス抗体のH鎖及びL鎖V領域の全塩基配列を決定し、塩基配列よりH鎖及びL鎖V領域の全アミノ酸配列を推定する。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

#### 【0145】

ハイブリドーマ細胞から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.), 154, 3 (1987)]、また全RNAからmRNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] 等があげられる。また、ハイブリドーマ細胞からmRNAを調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社製) 等があげられる。

#### 【0146】

cDNAの合成及びcDNAライブラリー作製法としては、常法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34]、或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL社製) や ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene社製) を用いる方法などがあげられる。

#### 【0147】

cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [ストラテジーズ(Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッツ・リサーチ(Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、λ zap II (Stratagene社製)、λ gt10、λ gt11 [ディーエヌエー・クローニング: ア・プラクティカル・アプローチ(DNA Cloning: A Practical Approach), I, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (Clontech社製)、λ ExCell、pT7T3 18U (Pharmacia社製)、pcD2 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] 及びpUC18 [ジーン(Gene), 33, 103 (1985)] 等が用いられる。

#### 【0148】

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌としては該cDNAライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [ストラテジーズ(Strategies), 5, 81 (1992)]、C600 [ジェネティックス(Genetics), 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] 及びJM105 [ジーン(Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

#### 【0149】

cDNAライブラリーからのヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAクローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはプラーク・ハイブリダイゼーション法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNAから合成したcDNA或いはcDNAライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction [以下、PCR法と表記する; モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34] によりH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAを調製することもできる。

#### 【0150】

上記方法により選択されたcDNAを、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.), 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、A. L. F. DNAシーケンサー (Pharmacia社製) 等を用いて解析することで該cDNAの塩基配列を決定することができる。

#### 【0151】

決定した塩基配列からH鎖及びL鎖V領域の全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体のH鎖及びL鎖V領域の全アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナル配列を含む抗体のH鎖及びL鎖V領域の完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

#### 【0152】

(3) ヒト以外の動物の抗体のV領域のアミノ酸配列の解析

分泌シグナル配列を含む抗体のH鎖及びL鎖V領域の完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のH鎖及びL鎖V領域の全アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、分泌シグナル配列の長さ及びN末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、H鎖及びL鎖V領域の各CDRのアミノ酸配列についても、既知の抗体のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することによって見出すことができる。

#### 【0153】

##### (4) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本項3の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAをクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAを、ヒト以外の動物の抗体H鎖及びL鎖V領域の3'末端側の塩基配列とヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域の5'末端側の塩基配列とから成り、かつ適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成DNAとそれぞれ連結し、それぞれを本項3の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

#### 【0154】

##### (5) ヒト型CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAは、以下のようにして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域のCDRを移植するヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のフレームワーク (以下、FRと表記する) のアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることが

できる。例えば、Protein Data Bank等のデータベースに登録されているヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のH鎖及びL鎖のV領域のFRの各サブグループの共通アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] 等があげられるが、その中でも、十分な活性を有するヒト型CDR移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性 (少なくとも60%以上) を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。

#### 【0155】

次に、選択したヒト抗体のH鎖及びL鎖V領域のFRのアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体のH鎖及びL鎖V領域のCDRのアミノ酸配列を移植し、ヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] を考慮してDNA配列に変換し、ヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を設計する。設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さから成る数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行う。この場合、PCRでの反応効率及び合成可能なDNAの長さから、H鎖、L鎖とも6本の合成DNAを設計することが好ましい。

#### 【0156】

また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項3の(1)で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR後、増幅産物をpBluescript SK(-) (Stratagene社製)等のプラスミドにクローニングし、本項3の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するプラスミドを取得する。

#### 【0157】

(6) ヒト型CDR移植抗体発現ベクターの構築

本項3の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子上流に、本項3の(5)で構築したヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域をコードするcDNAをクローニングし、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、本項3の(5)でヒト型CDR移植抗体のH鎖及びL鎖V領域を構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項3の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖及びL鎖C領域をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。

#### 【0158】

##### (7) ヒト化抗体の安定的生産

本項3の(4)及び(6)に記載のヒト化抗体発現ベクターを適当な動物細胞に導入することによりヒト型キメラ抗体及びヒト型CDR移植抗体(以下、併せてヒト化抗体と称す)を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

動物細胞へのヒト化抗体発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法[特開平2-257891; サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する動物細胞としては、ヒト化抗体を生産させることができる動物細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。

具体的には、マウスミエローマ細胞であるNS0細胞、SP2/0細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO/dhfr-細胞、CHO/DG44細胞、ラットミエローマYB2/0細胞、IR983F細胞、シリアンハムスター腎臓由来であるBHK細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ細胞などがあげられるが、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣細胞であるCHO/DG44細胞、ラットミエローマYB2/0細胞、5に記載本発明の宿主細胞等があげられる。

#### 【0159】

ヒト化抗体発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、G418 sulfate(以下、G418と表記する; SIGMA社製)等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。動



物細胞培養用培地としては、RPMI1640培地（日水製薬社製）、GIT培地（日本製薬社製）、EX-CELL302培地（JRH社製）、IMDM培地（GIBCO BRL社製）、Hybridoma-SFM培地（GIBCO BRL社製）、またはこれら培地に牛胎児血清（以下、FBSと表記する）等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の生産量及び抗原結合活性は酵素免疫抗体法〔以下、ELISA法と表記する；アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1998、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996〕等により測定できる。また、形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、DHFR遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

#### 【0160】

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインAカラムを用いて精製することができる〔アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996〕。また、その他に通常、タンパク質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体のH鎖、L鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動〔以下、SDS-PAGEと表記する；ネイチャー(Nature), 227, 680 (1970)〕やウエスタンブロッティング法〔アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996〕等で測定することができる。

以上、動物細胞を宿主とした抗体の製造方法を示したが、上述したように、細菌、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物個体あるいは植物個体においても製造することができる。

#### 【0161】

##### 4. 本発明の細胞を用いた免疫機能分子の製造

上記3. に記載の免疫機能分子を取得する方法を用い、上述の1. で調製した本発明の細胞に免疫機能分子を発現させ、該細胞を培養し、該培養上清から目的とする免疫機能分子を精製することで本発明の免疫機能分子を製造できる。

元来細胞自身が免疫機能分子を発現している場合には、細胞への免疫機能分子の発現ベクターの導入は必ずしも必要ではなく、1. に記載した方法に従い該宿主細胞を親株とした本発明の細胞を調製し、3. に記載の免疫機能分子を取得する方法を用い、該宿主細胞を培養し、該培養上清から目的とする免疫機能分子を精製することで本発明の免疫機能分子を製造できる。

#### 【0162】

##### 5. 各種宿主細胞で発現させた免疫機能分子の活性評価

精製した免疫機能分子の蛋白量、抗原との結合性あるいはエフェクター機能は、モノクローナルアンチボディズ、あるいはアンチボディエンジニアリング等に記載の公知の方法を用いて評価することができる。例えば、ヒト化抗体の場合、抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性はELISA法及び蛍光抗体法 [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)] 等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞障害活性は、CDC活性、ADCC活性等を測定することにより、評価することができる [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)]。更にヒト化抗体のヒトでの安全性、治療効果は、カニクイザル等のヒトに比較的近い動物種の適当なモデルを用いて評価することができる。

#### 【0163】

##### 6. 各種宿主細胞で発現させた免疫機能分子の糖鎖の分析

各種宿主細胞で発現させた免疫機能分子の糖鎖構造は、通常の糖タンパク質の

糖鎖構造の解析に準じて行うことができる。例えば、IgG分子に結合している糖鎖はガラクトース、マンノース、フコースなどの中性糖、N-アセチルグルコサミンなどのアミノ糖、シアル酸などの酸性糖から構成されており、糖組成分析および二次元糖鎖マップ法などを用いた糖鎖構造解析等の手法を用いて行うことができる。

#### 【0164】

##### (1) 中性糖・アミノ糖組成分析

免疫機能分子の糖鎖の組成分析は、トリフルオロ酢酸等で、糖鎖の酸加水分解を行うことにより、中性糖またはアミノ糖を遊離し、その組成比を分析することができる。

具体的な方法として、Dionex社製糖組成分析装置 (BioLC) を用いる方法が挙げられる。BioLCはHPAEC-PAD (high performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection) 法 [ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー (J.Liq.Chromatogr.), 6, 1577 (1983)] によって糖組成を分析する装置である。

また、2-アミノピリジンによる蛍光標識化法でも組成比を分析することができる。具体的には、公知の方法 [アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agruc.Biol.Chem.), 55(1), 283-284 (1991)] に従って酸加水分解した試料を2-アミノピリジル化で蛍光ラベル化し、HPLC分析して組成比を算出することができる。

#### 【0165】

##### (2) 糖鎖構造解析

免疫機能分子の糖鎖の構造解析は、二次元糖鎖マップ法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal.Biochem.), 171, 73 (1988)、生物化学実験法23-糖タンパク質糖鎖研究法 (学会出版センター) 高橋禮子編 (1989年)] により行うことができる。二次元糖鎖マップ法は、例えば、X軸には逆相クロマトグラフィー糖鎖の保持時間または溶出位置を、Y軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、それぞれプロットし、既知糖鎖のそれらの結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。

## 【0166】

具体的には、抗体をヒドラジン分解して、抗体から糖鎖を遊離し、2-アミノピリジン（以下、PAと略記する）による糖鎖の蛍光標識〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（J. Biochem.）, 95, 197 (1984)〕を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰のPA化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。次いで、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をもとに、2次元糖鎖マップ上にプロットし、糖鎖スタンダード（TaKaRa社製）、文献〔アナリティカル・バイオケミストリー（Anal. Biochem.）, 171, 73 (1988)〕とのスポットの比較より糖鎖構造を推定することができる。

さらに各糖鎖のMALDI-TOF-MSなどの質量分析を行い、2次元糖鎖マップ法により推定される構造を確認することができる。

## 【0167】

## 7. 各種宿主細胞における糖鎖の修飾に係わる酵素活性の比較

糖鎖の修飾に係わる酵素、すなわち糖転移酵素および糖分解酵素の各種宿主細胞における活性の比較は、文献〔新生化学実験講座3—糖質I, 糖タンパク質（東京化学同人）日本生化学会編（1988）〕、文献〔細胞工学, 別冊, 実験プロトコルシリーズ, グライコバイオロジー実験プロトコル, 糖タンパク質・糖脂質・プロテオグリカン（秀潤社製）谷口直之・鈴木明美・古川清・菅原一幸監修（1996）〕、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された生化学的な方法あるいは遺伝子工学的な方法を用いて行うことができる。生化学的な方法としては、例えば、酵素特異的な基質を用いて酵素活性を評価する方法が挙げられる。遺伝子工学的な方法としては、例えば、酵素遺伝子のmRNA量を測定するノーザン解析やRT-PCR法等が挙げられる。

## 【0168】

8. N-グリコシド結合糖鎖を有する免疫機能分子からなる組成物中に含まれる、還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合を変化させることで、所望のエフェクター機能を有する医薬を調製する方法

糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖を有する免疫機能分子は、例えば、上記4.に記載の本発明の免疫機能分子の製造方法を用いて取得することができ、取得された免疫機能分子からなる組成物を材料として用い、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合を変化させることによって、所望のエフェクター機能を有する医薬を調製することができる。糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖の割合を変化させるためには、例えば、該割合が異なる免疫機能分子組成物を混合したり、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンに糖が付加されていないN-グリコシド結合糖鎖を有する免疫機能分子組成物を精製し、精製した免疫機能分子組成物を添加することで任意の割合の医薬組成物を調製することができる。

#### 【0169】

9. 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が人為的に制御された細胞のスクリーニング方法。

本発明のスクリーニング方法は、糖タンパク質の修飾に係わる酵素の活性又は糖タンパク質の糖鎖の構造を指標に所望の突然変異体を選択する工程を含む。

具体的には、糖タンパク質の修飾に係わる酵素の活性あるいは糖タンパク質の糖鎖構造を指標に突然変異体をスクリーニングすることができ、例えば、前述の1.の(2)に記載の方法を用いて所望の突然変異体を選択することができる。

#### 【0170】

10. 本発明の免疫機能分子の利用

本発明の免疫機能分子は高いエフェクター機能を有しており、例えば、高いADCCあるいはCDC活性を有する抗体は、癌、アレルギー、循環器疾患、またはウイルスあるいは細菌感染をはじめとする各種疾患の予防および治療において有用である。

癌、すなわち悪性腫瘍は癌細胞が増殖する。通常の抗癌剤は癌細胞の増殖を抑制することを特徴とする。しかし、高いADCCあるいはCDC活性を有する抗体は、殺細胞効果により癌細胞を障害することにより癌を治療することができるため、通常の抗癌剤よりも治療薬として有効である。特に癌の治療薬において、現状

では抗体医薬単独の抗腫瘍効果は不十分であり、化学療法との併用療法が行われているが [サイエンス (Science), 280, 1197, 1998]、本発明の免疫機能分子単独でのより強い抗腫瘍効果が認められれば、化学療法に対する依存度が低くなり、副作用の低減にもなる。

#### 【0171】

アレルギー反応は、免疫細胞によるメディエータ分子の放出により惹起されるため、高いADCCあるいはCDC活性を有する抗体を用いて免疫細胞を除去することにより、アレルギー反応を抑えることができる。

#### 【0172】

循環器疾患としては、動脈硬化などがあげられる。動脈硬化は、現在バルーンカテーテルによる治療を行うが、治療後の再狭窄での動脈細胞の増殖を高いADCCあるいはCDC活性を有する抗体を用いて抑えることにより、循環器疾患を予防および治療することができる。

#### 【0173】

ウイルスまたは細菌に感染細胞を、高いADCCあるいはCDC活性を有する抗体を用いてウイルスまたは細菌に感染細胞の増殖を抑えることにより、ウイルスまたは細菌感染をはじめとする各種疾患の予防および治療することができる。

また、ADCCあるいはCDC活性が抑制された抗体は、自己免疫疾患において亢進された免疫反応を押さえるという観点から、自己免疫疾患の予防および治療において有用である。また、免疫抑制剤、不必要な細胞死の防止、血液性の癌の予防及び治療においても有用である。さらに、免疫機能分子のエフェクター機能以外の活性、例えば、認識抗原分子に対する中和活性などが主たる薬効として期待される医薬品の場合、強すぎるエフェクター作用による副作用を回避することができる。

#### 【0174】

本発明の免疫機能分子（抗体等）あるいは前述の免疫機能分子組成物を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ま

しい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

#### 【0175】

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。または、ヒト化抗体を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を調製することもできる。

#### 【0176】

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該化合物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該化合物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

#### 【0177】

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、有効成分の量として、通常成人1日当たり $10\mu\text{g/kg}$ ~ $20\text{mg/kg}$ である。

また、抗体の各種腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法は、インビトロ実験としては、CDC活性測定法、ADCC活性測定法等があげられ、インビボ実験としては、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等があげられる。

CDC活性、ADCC活性、抗腫瘍実験は、文献[キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunology Immunotherapy), 36, 373 (1993); キャンサー・リサーチ(Cancer Research), 54, 1511 (1994)]等記載の方法に従って行うことができる。

以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、実施例は本発明の単なる例示を示すものにすぎず、本発明の範囲を限定するものではない。

#### 【0178】

##### 【実施例】

実施例1. 抗ガングリオシドGD3ヒト型キメラ抗体の作製

1. 抗ガングリオシドGD3ヒト型キメラ抗体のタンデム型発現ベクターpChiLHGM4の構築

抗ガングリオシドGD3ヒト型キメラ抗体(以下、抗GD3キメラ抗体と表記する)のL鎖の発現ベクターpChi641LGM4[ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ(J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)]を制限酵素MluI(宝酒造社製)とSalI(宝酒造社製)で切断して得られるL鎖cDNAを含む約4.03kbの断片と動物細胞用発現ベクターpAGE107[サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]を制限酵素MluI(宝酒造社製)とSalI(宝酒造社製)で切断して得られるG418耐性遺伝子及びスプライシングシグナルを含む約3.40kbの断片をDNA Ligation



Kit (宝酒造社製) を用いて連結、大腸菌HB101株 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] を形質転換してプラスミド pChi641LGM40 を構築した。

#### 【0179】

次に、上記で構築したプラスミド pChi641LGM40 を制限酵素 ClaI (宝酒造社製) で切断後、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用いて平滑末端化し、更に MluI (宝酒造社製) で切断して得られる L鎖 cDNA を含む約 5.68kb の断片と抗 GD3 キメラ抗体の H鎖 の発現ベクター pChi641HGM4 [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)] を制限酵素 XhoI (宝酒造社製) で切断後、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用いて平滑末端化し、更に MluI (宝酒造社製) で切断して得られる H鎖 cDNA を含む約 8.40kb の断片を DNA Ligation Kit (宝酒造社製) を用いて連結、大腸菌 HB101 株 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] を形質転換して抗 GD3 キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pChi641LHGM4 を構築した。

#### 【0180】

### 2. 抗 GD3 キメラ抗体の安定生産細胞の作製

上記実施例 1 の 1 項で構築した抗 GD3 キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pChi641LHGM4 を各種細胞株に導入し、優良株を選択することで抗 GD3 キメラ抗体の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

#### (1) ラットミエローマ YB2/0 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 GD3 キメラ抗体発現ベクター pChi641LHGM4 の 5  $\mu$ g を  $4 \times 10^6$  細胞のラットミエローマ YB2/0 細胞へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、40ml の RPMI1640-FBS(10) [FBS(GIBCO BR L社製) を 10% 含む RPMI1640 培地] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に 200  $\mu$ l / ウェル ずつ分注した。5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃、24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/ml になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培

養上清を回収し、上清中の抗GD3キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示すELISA法により測定した。

#### 【0 1 8 1】

培養上清中に抗GD3キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418を0.5mg/ml、DHFRの阻害剤であるメソトレキセート（以下、MTXと表記する；SIGMA社製）を50nM含むRPMI1640-FBS(10)培地に $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/mlになるように懸濁し、24ウェルプレート（Greiner社製）に2mlずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃で1～2週間培養して、50nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗GD3キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示すELISA法により測定した。培養上清中に抗GD3キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を100nM、200nMと順次上昇させ、最終的にG418を0.5mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むRPMI1640-FBS(10)培地で増殖可能かつ、抗GD3キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行った。尚、実施例 8 に示す  $\alpha$ —1、6—フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

#### 【0 1 8 2】

このようにして得られた抗GD3キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローン7-9-51は平成 1 1 年 4 月 5 日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）にFERM BP-6691として寄託されている。

#### 【0 1 8 3】

##### （2）CHO/DG44細胞を用いた生産細胞の作製

抗GD3キメラ抗体発現ベクターpChi641LHGM4の4  $\mu$ gを $1.6 \times 10^6$ 細胞のCHO/DG44細胞へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、10mlのIMDM-FBS(10) [FBSを10%、HT supplement (GIBCO BRL社製)を1倍濃度で含むIMDM培地] に懸濁し、96ウェル培養用プレート（岩城硝子社製）に200  $\mu$ l/ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃、

24時間培養した後、G418を0.5mg/mlになるように添加して1～2週間培養した。G418耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗GD3キメラ抗体の抗原結合活性を実施例1の3項に示すELISA法により測定した。

#### 【0184】

培養上清中に抗GD3キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418を0.5mg/ml、MTXを10nM含むIMDM-dFBS(10)培地〔透析牛胎児血清(以下、dFBSと表記する；GIBCO BRL社製)を10%含むIMDM培地〕に $1\sim 2\times 10^5$ 細胞/mlになるように懸濁し、24ウェルプレート(岩城硝子社製)に0.5mlずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃で1～2週間培養して、10nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を100nMに上昇させ、最終的にG418を0.5mg/ml、MTXを100nMの濃度で含むIMDM-dFBS(10)培地で増殖可能かつ、抗GD3キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2回の限界希釈法による単一細胞化(クローン化)を行った。尚、実施例8に示す $\alpha$ -1、6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

#### 【0185】

##### (3) マウスミエローマNS0細胞を用いた生産細胞の作製

抗GD3キメラ抗体発現ベクターpChi641LHGM4の5 $\mu$ gを $4\times 10^6$ 細胞のマウスミエローマNS0細胞へエレクトロポレーション法〔サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133, 1990〕により導入後、40mlのEX-CELL302-FBS(10)〔FBSを10%、L-グルタミン(以下、L-Glnと表記する；GIBCO BRL社製)を2mM含むEX-CELL302培地〕に懸濁し、96ウェル培養用プレート(住友ベークライト社製)に200 $\mu$ l/ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃、24時間培養した後、G418を0.5mg/mlになるように添加して1～2週間培養した。G418耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗GD3キメラ抗体の抗原結合活性を実施例1の3項に示すELISA法により測定した。

## 【0186】

培養上清中に抗GD3キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418を0.5mg/ml、MTXを50nM含むEX-CELL302-dFBS(10)培地（dFBSを10%、L-Glnを2mM含むEX-CELL302培地）に $1\sim 2\times 10^5$ 細胞/mlになるように懸濁し、24ウェルプレート（Greiner社製）に2mlずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃で1～2週間培養して、50nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗GD3キメラ抗体の抗原結合活性を実施例1の3項に示すELISA法により測定した。培養上清中に抗GD3キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を100nM、200nMと順次上昇させ、最終的にG418を0.5mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むEX-CELL302-dFBS(10)培地で増殖可能かつ、抗GD3キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行った。尚、実施例8に示す $\alpha$ -1、6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

## 【0187】

## 3. 抗体のGD3に対する結合活性の測定（ELISA法）

抗体のGD3に対する結合活性は以下のようにして測定した。

4nmolのGD3を10 $\mu$ gのジパルミトイルフォスファチジルコリン（SIGMA社製）と5 $\mu$ gのコレステロール（SIGMA社製）とを含む2mlのエタノール溶液に溶解した。該溶液の20 $\mu$ l（40pmol/ウェルとなる）を96ウェルのELISA用のプレート（Greiner社製）の各ウェルにそれぞれ分注し、風乾後、1%牛血清アルブミン（以下、BSAと表記する；SIGMA社製）を含むPBS（以下、1%BSA-PBSと表記する）を100 $\mu$ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、形質転換株の培養上清或いは精製したヒト型キメラ抗体の各種希釈溶液を50 $\mu$ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、各ウェルを0.05%Tween20（和光純薬社製）を含むPBS（以下、Tween-PBSと表記する）で洗浄後、1%BSA-PBSで3000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(H&L)抗体溶液（

American Qualex社製) を二次抗体溶液として、50  $\mu$  l/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液 [2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウム] の0.55gを1Lの0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.2)に溶解し、使用直前に過酸化水素を1  $\mu$  l/mlで添加した溶液) を50  $\mu$  l/ウェルで加えて発色させ、415nmの吸光度 (以下、OD415と表記する) を測定した。

#### 【0188】

##### 4. 抗GD3キメラ抗体の精製

###### (1) YB2/0細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例1の2項(1)で得られた抗GD3キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンをBSAを0.2%、MTXを200nM、トリヨードチロニン (以下、T3と表記する; SIGMA社製) を100nMの濃度で含むHybridoma-SFM培地に $3 \times 10^5$ 細胞/mlとなるように懸濁し、2.0Lスピナーボトル (岩城硝子社製) を用いて50rpmの速度で攪拌培養した。37℃の恒温室内で10日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりProsep-A (Bioprocessing社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗GD3キメラ抗体を精製した。精製した抗GD3キメラ抗体は、YB2/0-GD3キメラ抗体と名付けた。

#### 【0189】

###### (2) CHO/DG44細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例1の2項(2)で得られた抗GD3キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンをL-Glnを3mM、脂肪酸濃縮液 (以下、CDLCと表記する; GIBCO BRL社製) を0.5%、プルロニックF68 (以下、PF68と表記する; GIBCO BRL社製) を0.3%の濃度で含むEX-CELL302培地に $1 \times 10^6$ 細胞/mlとなるように懸濁し、175mm<sup>2</sup>フラスコ (Greiner社製) に50mlずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃で4日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりProsep-A (Bioprocessing社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗GD3キメラ抗体を精製した。精製した抗GD3キメラ抗体は、CHO/DG44-GD3キメラ抗体と名付けた。

#### 【0190】

###### (3) NS0細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例 1 の 2 項 (3) で得られた抗GD3キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンをL-Glnを2mM、G418を0.5mg/ml、MTXを200nM、FBSを1%の濃度で含むEX-CELL302培地に $1 \times 10^6$ 細胞/mlとなるように懸濁し、175mm<sup>2</sup>フラスコ (Greiner社製) に200mlずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃で4日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりProsep-A (Bioprocessing社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗GD3キメラ抗体を精製した。精製した抗GD3キメラ抗体は、NS0-GD3キメラ抗体 (302) と名付けた。また、該形質転換細胞クローンをG418を0.5mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むGIT培地に $3 \times 10^5$ 細胞/mlとなるように懸濁し、175mm<sup>2</sup>フラスコ (Greiner社製) に200mlずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃で10日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりProsep-A (Bioprocessing社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗GD3キメラ抗体を精製した。精製した抗GD3キメラ抗体は、NS0-GD3キメラ抗体 (GIT) と名付けた。

#### 【0191】

##### (4) SP2/0細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

特開平5-304989に記載の抗GD3キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンをG418を0.5mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むGIT培地に $3 \times 10^5$ 細胞/mlとなるように懸濁し、175mm<sup>2</sup>フラスコ (Greiner社製) に200mlずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃で8日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりProsep-A (Bioprocessing社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗GD3キメラ抗体を精製した。精製した抗GD3キメラ抗体は、SP2/0-GD3キメラ抗体と名付けた。

#### 【0192】

##### 5. 精製した抗GD3キメラ抗体の解析

上記実施例 1 の 4 項で得られた各種動物細胞で生産、精製した5種類の抗GD3キメラ抗体の各4μgを公知の方法 [ネイチャー (Nature), 227, 680, 1970] に従ってSDS-PAGEし、分子量及び製精度を解析した。その結果を図1に示した。図1に示したように、精製した各抗GD3キメラ抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約150キログルトン (以下、Kdと表記する) の単一のバンドが、還元条件下では約50Kdと約25Kdの2本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体のH鎖

及びL鎖のcDNAの塩基配列から推定される分子量 (H鎖: 約49Kd、L鎖: 約23Kd、分子全体: 約144Kd) とほぼ一致し、更に、IgG型の抗体は、非還元条件下では分子量は約150Kdであり、還元条件下では分子内のジスルフィド結合 (以下、S-S結合と表記する) が切断され、約50Kdの分子量を持つH鎖と約25Kdの分子量を持つL鎖に分解されるという報告 [アンティボディズ: ア・ラボラトリー・マニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988、モノクローナル・アンティボディズ: プリンシプルズ・アンド・プラクティス (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996] と一致し、各抗GD3キメラ抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ精製されたことが確認された。

### 【0193】

#### 実施例 2. 抗GD3キメラ抗体の活性評価

##### 1. 抗GD3キメラ抗体のGD3に対する結合活性 (ELISA法)

上記実施例 1 の 4 項で得られた5種類の精製抗GD3キメラ抗体のGD3 (雪印乳業社製) に対する結合活性を実施例 1 の 3 項に示すELISA法により測定した。図 2 は、添加する抗GD3キメラ抗体の濃度を変化させて結合活性を検討した結果である。図 2 に示したように、5種類の抗GD3キメラ抗体は、ほぼ同等のGD3に対する結合活性を示した。この結果は抗体の抗原結合活性は、抗体を生産する動物細胞やその培養方法に関わらず、一定であることを示している。また、NS0-GD3キメラ抗体 (302) とNS0-GD3キメラ抗体 (GIT) の比較から抗原結合活性は、培養に用いる培地にも依らず、一定であることが示唆された。

### 【0194】

##### 2. 抗GD3キメラ抗体のin vitro細胞障害活性 (ADCC活性)

上記実施例 1 の 4 項で得られた5種類の精製抗GD3キメラ抗体のin vitro細胞障害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、ADCC活性を測定した。

##### (1) 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FBS(10)培地で培養したヒトメラノーマ培養細胞株G-361 (ATCC CRL1424) の $1 \times 10^6$ 細胞を調製し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を3.7MBq当量加えて37℃で1時間反応させ、細胞を放射標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10)培地で懸

濁及び遠心分離操作により3回洗浄し、培地に再懸濁し、4℃で30分間水中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10)培地を5ml加え、 $2 \times 10^5$ 細胞/mlに調製し、標的細胞溶液とした。

#### 【0195】

##### (2) エフェクター細胞溶液の調製

健常人静脈血50mlを採取し、ヘパリンナトリウム（武田薬品社製）0.5mlを加え穏やかに混ぜた。これをLymphoprep（Nycomed Pharma AS社製）を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10)培地で3回遠心分離して洗浄後、培地を用いて $2 \times 10^6$ 細胞/mlの濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

#### 【0196】

##### (3) ADCC活性の測定

96ウェルU字底プレート（Falcon社製）の各ウェルに上記（1）で調製した標的細胞溶液の $50 \mu\text{l}$ （ $1 \times 10^4$ 細胞/ウェル）を分注した。次いで（2）で調製したエフェクター細胞溶液を $100 \mu\text{l}$ （ $2 \times 10^5$ 細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は20:1となる）添加した。更に、各種抗GD3キメラ抗体を各最終濃度0.0025～ $2.5 \mu\text{g/ml}$ となるように加え、37℃で4時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の $^{51}\text{Cr}$ 量を $\gamma$ -カウンターにて測定した。自然解離 $^{51}\text{Cr}$ 量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の $^{51}\text{Cr}$ 量を測定することにより求めた。全解離 $^{51}\text{Cr}$ 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに1規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の $^{51}\text{Cr}$ 量を測定することにより求めた。ADCC活性は下式により求めた。

#### 【0197】



## 【数 1】

式 (1)

$$\text{ADCC 活性 (\%)} = \frac{\text{検体上清中の } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}}{\text{全解離 } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}} \times 100$$

## 【0198】

その結果を図3に示した。図3に示したように、5種類の抗GD3キメラ抗体のうち、YB2/0-GD3キメラ抗体が最も高いADCC活性を示し、次いでSP2/0-GD3キメラ抗体、NS0-GD3キメラ抗体、CHO-GD3キメラ抗体の順に高いADCC活性を示した。培養に用いた培地の異なるNS0-GD3キメラ抗体(302)とNS0-GD3キメラ抗体(GIT)では、それらのADCC活性に差は認められなかった。以上の結果は、抗体のADCC活性は、生産に用いる動物細胞によって大きく異なることを示している。その機構としては、抗原結合活性が同等であったことから、抗体のFc領域の構造の差に起因していることが推定された。

## 【0199】

実施例3. 抗ヒトインターロイキン5レセプター $\alpha$ 鎖ヒト型CDR移植抗体の作製

1. 抗ヒトインターロイキン5レセプター $\alpha$ 鎖ヒト型CDR移植抗体の安定生産細胞の作製

(1) ラットミエローマYB2/0細胞を用いた生産細胞の作製

WO97/10354に記載の抗ヒトインターロイキン5レセプター $\alpha$ 鎖ヒト型CDR移植抗体(以下、抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体と表記する)の発現ベクターpKANTEX1259HV3LV0を各種細胞株に導入し、優良株を選択することで抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX1259HV3LV0の5 $\mu$ gを4 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞のラットミエローマYB2/0細胞へエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133, 1990]により導入後、40mlのRPMI1640-FBS(10)に懸濁し、96ウェル培養用プレート(住友ベークライト社製)に200 $\mu$ l/ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃、24時間培養した後、G418を0.5mg/m

1になるように添加して1~2週間培養した。G418耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗hIL-5R  $\alpha$  CDR移植抗体の抗原結合活性を実施例3の2項に示すELISA法により測定した。

#### 【0200】

培養上清中に抗hIL-5R  $\alpha$  CDR移植抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418を0.5mg/ml、MTXを50nM含むRPMI1640-FBS(10)培地に $1\sim 2\times 10^5$ 細胞/mlになるように懸濁し、24ウェルプレート（Greiner社製）に2mlずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃で1~2週間培養して、50nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗hIL-5R  $\alpha$  CDR移植抗体の抗原結合活性を実施例3の2項に示すELISA法により測定した。培養上清中に抗hIL-5R  $\alpha$  CDR移植抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を100nM、200nMと順次上昇させ、最終的にG418を0.5mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むRPMI1640-FBS(10)培地で増殖可能かつ、抗hIL-5R  $\alpha$  CDR移植抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2回の限界希釈法による単細胞化（クローン化）を行った。尚、実施例8に示す $\alpha$ -1、6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。このようにして得られた抗hIL-5R  $\alpha$  CDR移植抗体を生産する形質転換細胞クローンNo.3は平成11年4月5日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）にFERM BP-6690として寄託されている。

#### 【0201】

##### （2）CHO/dhfr-細胞を用いた生産細胞の作製

WO97/10354に記載の抗hIL-5R  $\alpha$  CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX1259HV3LV0の4 $\mu$ gを $1.6\times 10^6$ 細胞のCHO/dhfr-細胞へエレクトロポレーション法〔サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]により導入後、10mlのIMDM-FBS(10)に懸濁し、96ウェル培養用プレート（岩城硝子社製）に200 $\mu$ l/ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃、24時間培養した後、G418を0.5mg/mlに

なるように添加して1~2週間培養した。G418耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗hIL-5R $\alpha$ CDR移植抗体の抗原結合活性を実施例3の2項に示すELISA法により測定した。

#### 【0202】

培養上清中に抗hIL-5R $\alpha$ CDR移植抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、DHFR遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418を0.5mg/ml、MTXを10nM含むIMDM-dFBS(10)培地に1~2 $\times 10^5$ 細胞/mlになるように懸濁し、24ウェルプレート（岩城硝子社製）に0.5mlずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃で1~2週間培養して、10nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を100nM、500nMに上昇させ、最終的にG418を0.5mg/ml、MTXを500nMの濃度で含むIMDM-dFBS(10)培地で増殖可能かつ、抗hIL-5R $\alpha$ CDR移植抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行った。尚、実施例8に示す $\alpha$ -1、6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として選択し用いた。

#### 【0203】

##### （3）マウスミエローマNS0細胞を用いた生産細胞の作製

ヤラントン（Yarranton）らの方法〔バイオ/テクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 10, 169 (1992)]に従い、W097/10354に記載の抗hIL-5R $\alpha$ CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX1259HV3LV0上の抗体H鎖及びL鎖cDNAを用いて抗hIL-5R $\alpha$ CDR移植抗体発現ベクターを作製し、NS0細胞を形質転換し、抗hIL-5R $\alpha$ CDR移植抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2回の限界希釈法による単一細胞化（クローン化）を行った。尚、実施例8に示す $\alpha$ -1、6-フコシルトランスフェラーゼの遺伝子の転写物の定量法を用い、該転写物の量が比較的低い株を優良株として用いた。

#### 【0204】

##### 2. 抗体のhIL-5R $\alpha$ に対する結合活性の測定（ELISA法）

抗体のhIL-5R $\alpha$ に対する結合活性は以下のようにして測定した。

W097/10354に記載の抗hIL-5R $\alpha$ マウス抗体KM1257をPBSで10 $\mu$ g/mlの濃度に希釈した溶液の50 $\mu$ lを96ウェルのELISA用のプレート（Greiner社製）の各ウェルにそれぞれ分注し、4℃で20時間反応させた。反応後、1%BSA-PBSを100 $\mu$ l/ウェルに加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、W097/10354に記載の可溶性hIL-5R $\alpha$ を1%BSA-PBSで0.5 $\mu$ g/mlの濃度に希釈した溶液を50 $\mu$ l/ウェルに加え、4℃で20時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄後、形質転換株の培養上清或いは精製したヒト型CDR移植抗体の各種希釈溶液を50 $\mu$ l/ウェルに加え、室温で2時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄後、1%BSA-PBSで3000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(H&L)抗体溶液（American Qualex社製）を二次抗体溶液として、50 $\mu$ l/ウェルに加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウムの0.55gを1Lの0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.2)に溶解し、使用直前に過酸化水素を1 $\mu$ l/mlで添加した溶液]を50 $\mu$ l/ウェルに加えて発色させ、OD415を測定した。

## 【0205】

### 3. 抗hIL-5R $\alpha$ CDR移植抗体の精製

#### (1) YB2/0細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例3の1項(1)で得られた抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体を生産する形質転換細胞クローンをG418を0.5mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むGIT培地に3 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/mlとなるように懸濁し、175mm<sup>2</sup>フラスコ（Greiner社製）に200mlずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃で8日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりイオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過法を用いて抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体を精製した。精製した抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体は、YB2/0-hIL-5RCDR抗体と名付けた。

#### (2) CHO/dhfr-細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例3の1項(2)で得られた抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体を生産する形質転換細胞クローンをL-Glnを3mM、CDLCを0.5%、PF68を0.3%の濃度で含むEX-CELL302培地に3 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/mlとなるように懸濁し、4.0Lスピナーボトル（岩城硝子社

製)を用いて100rpmの速度で攪拌培養した。37℃の恒温室内で10日間培養後、培養上清を回収した。培養上清よりイオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過法を用いて抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体を精製した。精製した抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体は、CHO/d-hIL-5RCDR抗体と名付けた。

#### 【 0 2 0 6 】

##### (3) NS0細胞由来の生産細胞の培養及び抗体の精製

上記実施例3の1項(3)で得られた抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体を生産する形質転換細胞クローンをヤラントン(Yarranton)らの方法[バイオ/テクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 10, 169 (1992)]に従い、培養後、培養上清を回収した。培養上清よりイオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過法を用いて抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体を精製した。精製した抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体は、NS0-hIL-5RCDR抗体と名付けた。

#### 【 0 2 0 7 】

##### 4. 精製した抗hIL-5R $\alpha$ CDR移植抗体の解析

上記実施例3の3項で得られた各種動物細胞で生産、精製した3種類の抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体の各4 $\mu$ gを公知の方法[ネイチャー(Nature), 227, 680 (1970)]に従ってSDS-PAGEし、分子量及び精製度を解析した。その結果を図4に示した。図4に示したように、精製した各抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約150Kdの単一のバンドが、還元条件下では約50Kdと約25Kdの2本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体のH鎖及びL鎖のcDNAの塩基配列から推定される分子量(H鎖：約49Kd、L鎖：約23Kd、分子全体：約144Kd)とほぼ一致し、更に、IgG型の抗体は、非還元条件下では分子量は約150Kdであり、還元条件下では分子内のジスルフィド結合(以下、S-S結合と表記する)が切断され、約50Kdの分子量を持つH鎖と約25Kdの分子量を持つL鎖に分解されるという報告[アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996]と一致し、各抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、か

つ、精製されたことが確認された。

### 【0208】

実施例 4. 抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体の活性評価

#### 1. 抗hIL-5R $\alpha$ CDR移植抗体のhIL-5R $\alpha$ に対する結合活性 (ELISA法)

上記実施例 3 の 3 項で得られた 3 種類の精製抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体のhIL-5R $\alpha$  に対する結合活性を実施例 3 の 2 項に示すELISA法により測定した。図 5 は、添加する抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体の濃度を変化させて結合活性を検討した結果である。図 5 に示したように、3種類の抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体は、ほぼ同等のhIL-5R $\alpha$  に対する結合活性を示した。この結果は実施例 2 の 1 項の結果と同様に、抗体の抗原結合活性は、抗体を生産する動物細胞やその培養方法に関わらず、一定であることを示している。

### 【0209】

#### 2. 抗hIL-5R $\alpha$ CDR移植抗体のin vitro細胞障害活性 (ADCC活性)

上記実施例 3 の 3 項で得られた 3 種類の精製抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体のin vitro細胞障害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、ADCC活性を測定した。

##### (1) 標的細胞溶液の調製

W097/10354に記載のhIL-5R $\alpha$  鎖及び $\beta$  鎖を発現しているマウスT細胞株CTLL-2(h5R)をRPMI1640-FBS(10)培地で培養し、 $1 \times 10^6$ 細胞/0.5mlとなるように調製し、放射性物質である $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を3.7MBq当量加えて37℃で1.5時間反応させ、細胞を放射標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10)培地で懸濁及び遠心分離操作により3回洗浄し、培地に再懸濁し、4℃で30分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10)培地を5ml加え、 $2 \times 10^5$ 細胞/mlに調製し、標的細胞溶液とした。

### 【0210】

##### (2) エフェクター細胞溶液の調製

健常人静脈血50mlを採取し、ヘパリンナトリウム (武田薬品社製) 0.5mlを加え穏やかに混ぜた。これをPolymorphprep (Nycomed Pharma AS社製) を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10)培地で3回遠心分離して洗浄後、培地を用いて $9 \times 10^6$ 細胞/mlの濃度で再懸濁し、エフェ

クター細胞溶液とした。

### 【0211】

#### (3) ADCC活性の測定

96ウェルU字底プレート (Falcon社製) の各ウェルに上記 (1) で調製した標的細胞溶液の $50\mu\text{l}$  ( $1\times 10^4$ 細胞/ウェル) を分注した。次いで (2) で調製したエフェクター細胞溶液を $100\mu\text{l}$  ( $9\times 10^5$ 細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は90:1となる) 添加した。更に、各種抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体を各最終濃度 $0.001\sim 0.1\mu\text{g/ml}$ となるように加え、 $37^\circ\text{C}$ で4時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の $^{51}\text{Cr}$ 量を $\gamma$ -カウンターにて測定した。自然解離 $^{51}\text{Cr}$ 量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の $^{51}\text{Cr}$ 量を測定することにより求めた。全解離 $^{51}\text{Cr}$ 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに1規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の $^{51}\text{Cr}$ 量を測定することにより求めた。ADCC活性は前記式 (1) により求めた。

### 【0212】

その結果を図6に示した。図6に示したように、3種類の抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体のうち、YB2/0-hIL-5RCDR抗体が最も高いADCC活性を示し、次いでCHO/d-hIL-5RCDR抗体、NS0-hIL-5RCDR抗体の順に高いADCC活性を示した。以上の結果は実施例2の2項の結果と同様に、抗体のADCC活性は、生産に用いる動物細胞によって大きく異なることを示している。更に、2種類のヒト化抗体のいずれの場合もYB2/0細胞で生産した抗体が最も高いADCC活性を示したことから、YB2/0細胞を用いることにより、ADCC活性の高い抗体を製造できることが明らかとなった。

### 【0213】

#### 3. 抗hIL-5R $\alpha$ CDR移植抗体のin vivoにおける活性評価

上記実施例3の3項で得られた3種類の精製抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体のin vivoにおける活性を評価するため、以下に示す方法に従い、カニクイザルのhIL-5誘発好酸球増加モデルに対する抑制作用を検討した。

カニクイザルに初日よりhIL-5 (調製方法はW097/10354に記載) を $1\mu\text{g/kg}$ で1日1回、計14回背部皮下より投与した。各種抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体を0日のhIL-

5の投与1時間前に0.3mg/kgで静脈内に単回投与した。抗体非投与群をコントロールとして用いた。抗体投与群は各群3頭（No.301、No.302、No.303、No.401、No.402、No.403、No.501、No.502、No.503）、抗体非投与群は2頭（No.101、No.102）のカニクイザルを用いた。投与開始の7日前より投与後42日目まで経時的に約1mlの血液を伏在静脈または大腿静脈より採取し、1 $\mu$ lの末梢血中の好酸球数を測定した。その結果を図7に示した。図7に示したように、YB2/0-hIL-5RCDR抗体を投与した群では、血中好酸球の増加が完全に抑制された。一方、CHO/d-hIL-5RCDR抗体の投与群では、1頭で完全な抑制作用が認められたものの、2頭ではその抑制作用は不十分であった。NS0-hIL-5RCDR抗体の投与群では、完全な抑制作用は認められず、その効果は不十分であった。

#### 【0214】

以上の結果は、抗体のin vivo活性は、生産に用いる動物細胞によって大きく異なることを示している。更に、抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体ではそのin vivo活性の高さは、実施例4の2項で述べたADCC活性の高さと正の相関が認められたことから、その活性発現には、ADCC活性の高さが極めて重要であることが示唆された。

以上の結果から、ADCC活性の高い抗体は、ヒトの各種疾患の臨床においても有用であることが期待される。

#### 【0215】

実施例5. ADCC活性を高める糖鎖の解析

##### 1. 2-アミノピリジン標識糖鎖（PA化糖鎖）の調製

本発明のヒト化抗体を塩酸による酸加水分解にてシアル酸を除去した。塩酸を完全に除去した後、ヒドラジン分解により糖鎖をタンパク質から切断した〔メソッド・オブ・エンザイモロジー（Method of Enzymology）, 83, 263, 1982〕。ヒドラジンを除去した後、酢酸アンモニウム水溶液と無水酢酸加えてN-アセチル化を行った。凍結乾燥後、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（J. Biochem.）, 95, 197（1984）〕。蛍光標識した糖鎖（PA化糖鎖）を、Surperdex Peptide HR 10/30カラム（Pharmacia社製）を用いて不純物と分離した。糖鎖画分を遠心濃縮機にて乾固させ、精製PA化糖鎖とした。



## 【 0 2 1 6 】

2. 精製抗hIL-5R  $\alpha$  CDR移植抗体のPA化糖鎖の逆相HPLC分析

上記実施例5の1項で調製した各種抗hIL-5RCDR抗体のPA化糖鎖を用いて、CLC-ODSカラム（Shimadzu社製）による逆相HPLC分析を行った。過剰量の $\alpha$ -L-フコシダーゼ（ウシ腎由来、SIGMA社製）をPA化糖鎖に添加して消化を行い（37℃、15時間）、逆相HPLCで分析した（図8）。アスパラギン結合糖鎖は30分間から80分間の範囲に溶出することをTaKaRa社製PA化糖鎖スタンダードを用いて確認した。 $\alpha$ -L-フコシダーゼ消化によって、逆相HPLCの溶出位置が移動する糖鎖（48分間から78分間に溶出される糖鎖）の全体に占める割合を計算した。結果を第1表に示す。

## 【 0 2 1 7 】

【表1】

第 1 表

抗体の生産細胞	$\alpha$ 1-6フコース結合糖鎖（％）
YB2/0	47
NS0	73

## 【 0 2 1 8 】

YB2/0細胞で生産させた抗hIL-5RCDR移植抗体は約47%、NS0細胞で生産させた抗hIL-5RCDR移植抗体は約73%が $\alpha$ 1-6フコースをもつ糖鎖であった。よって、YB2/0細胞で生産した抗体は、NS0細胞で生産した抗体と比較して $\alpha$ 1-6フコースを持たない糖鎖が多かった。

## 【 0 2 1 9 】

3. 精製抗hIL-5R  $\alpha$  CDR移植抗体の単糖組成分析

トリフルオロ酢酸による酸加水分解により、YB2/0細胞、NS0細胞およびCHO/d細胞で生産した抗hIL-5R  $\alpha$  CDR移植抗体の糖鎖を単糖に分解し、BioLC（Dionex社製）を用いて単糖組成分析を行った。

N-グリコシド結合糖鎖のうち、コンプレックス型では、1本の糖鎖におけるマンノース数は3であるため、マンノースを3として計算した場合の各単糖の相対比を第2表に示す。

【0220】

【表2】

第 2 表

抗体の生産細胞	Fuc	GlcNAc	Gal	Man	ADCC 活性(%)*
YB2/0	0.60	4.98	0.30	3.00	42.27
NS0	1.06	3.94	0.66	3.00	16.22
CHO/dhfr-	0.85	3.59	0.49	3.00	25.73
CHO/dhfr-	0.91	3.80	0.27	3.00	25.73

\*抗体濃度 0.01 $\mu$ g/ml

【0221】

フコースの相対比は、YB2/0<CHO/d<NS0であり、本結果でもYB2/0細胞で生産した抗体の糖鎖はフコース含量が最も低かった。

【0222】

実施例6. CHO/dhfr-細胞生産抗体の糖鎖解析

CHO/dhfr-細胞で生産した精製抗hIl-5R $\alpha$  CDR移植抗体からPA化糖鎖を調製し、CLC-ODSカラム（島津社製）を用いて逆相HPLC分析を行った（図9）。図9において、溶出時間35～45分間がフコースを持たない糖鎖、45～60分間がフコースを持つ糖鎖であった。CHO/dhfr-細胞で生産した抗hIl-5R $\alpha$  CDR移植抗体は、マウスミエローマNS0細胞で生産させた抗体と同様に、ラットミエローマYB2/0細胞で生産させた抗体よりもフコースを持たない糖鎖の含量が少なかった。

【0223】

実施例7. 高ADCC活性抗体の分離

フコースを持つ糖鎖に結合するレクチンカラムを用いて、ラットミエローマYB2/0細胞で生産させた抗hIl-5R $\alpha$  CDR移植抗体の分離を行った。HPLCは島津社製LC-6Aを用い、流速は1ml/分、カラム温度は室温で行った。50mMトリス-硫酸緩衝液（pH7.3）で平衡化し、精製された抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体を注入後、0.2M $\alpha$ -メチルマンノシド（ナカライテスク社製）の直線濃度勾配（60分間）にて溶出した。抗hI

1-5R  $\alpha$  CDR移植抗体を非吸着画分と吸着画分とに分離した。非吸着画分、吸着画分の一部をとり、hIL-5R  $\alpha$  に対する結合活性を測定すると、同様の結合活性を示した(図10 上図)。ADCC活性を測定すると、非吸着画分の方が吸着画分の一部よりも高い(100~1000倍) ADCC活性を示した(図10 下図)。さらに、非吸着画分、吸着画分の一部からPA化糖鎖を調製し、CLC-ODSカラム(島津社製)を用いて逆相HPLC分析を行った(図11)。非吸着画分は主としてフコースのない糖鎖をもつ抗体であり、吸着画分の一部は主としてフコースがある糖鎖をもつ抗体であった。

#### 【0224】

実施例8. 宿主細胞株における  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ(FUT8) 遺伝子の転写物の定量

##### (1) 各種細胞株由来一本鎖cDNAの調製

ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(dhfr)を欠損したチャイニーズハムスター卵巣由来CHO/DG44細胞およびラットミエローマYB2/0細胞より、以下の手順で一本鎖cDNAを調製した。

CHO/DG44細胞を10% ウシ胎児血清(Life Technologies社製)および1倍濃度のHT supplement(Life Technologies社製)を添加したIMDM培地(Life Technologies社製)に懸濁し、 $2 \times 10^5$ 個/mlの密度で接着細胞培養用T75フラスコ(Greiner社製)に15ml播種した。また、YB2/0細胞を10% ウシ胎児血清(Life Technologies社製)、4mmol/l L-グルタミン(Life Technologies社製)を添加したRPMI1640培地(Life Technologies社製)に懸濁し、 $2 \times 10^5$ 個/mlの密度で浮遊細胞培養用T75フラスコ(Greiner社製)に15ml播種した。これらを37℃の5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養し、培養1日目、2日目、3日目、4日目および5日目に各宿主細胞 $1 \times 10^7$ 個を回収後、RNAeasy(QIAGEN社製)により添付の説明書に従って全RNAを抽出した。

#### 【0225】

全RNAを45  $\mu$ lの滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase(Promega社製)1  $\mu$ l、付属の10 $\times$ DNase buffer 5  $\mu$ l、RNasin Ribonuclease inhibitor(Promega社製) 0.5  $\mu$ lをそれぞれに添加して、37℃で30分間反応させることにより、試料

中に混入したゲノムDNAを分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN社製) により全RNAを再精製し、50  $\mu$  lの滅菌水に溶解した。

得られた各々の全RNA3  $\mu$  gに対し、SUPERScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ(dT)をプライマーとした20  $\mu$  lの系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖cDNAを合成した。各宿主細胞由来FUT8、 $\beta$ -アクチンのクローニングには該反応液の1倍濃度液を、競合的PCRによる各遺伝子転写量の定量には該反応液の50倍希釈水溶液を用い、各々使用するまで-80℃で保管した。

#### 【0 2 2 6】

(2) チャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8の各cDNA部分断片の取得

チャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8の各cDNA部分断片の取得は、以下の手順で行った(図12)。

まず、ヒトFUT8のcDNA[ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 121, 626, (1997)]およびブタFUT8のcDNA[ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 271, 27810, (1996)]に共通の塩基配列に対して特異的なプライマー(配列番号4および配列番号5に示す)を設計した。

次にDNAポリメラーゼExTaq(宝酒造社製)を用いて、本項(1)で調製した培養2日目のCHO細胞由来cDNAおよびYB2/O細胞由来cDNAを各々1  $\mu$  lを含む25  $\mu$  lの反応液[ExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5  $\mu$  mol/l 上記遺伝子特異的プライマー(配列番号4および配列番号5)]を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行った。PCRは、94℃で1分間の加熱の後、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして30サイクルの後、さらに72℃で10分間加熱する条件で行った。

#### 【0 2 2 7】

PCR後、反応液を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片979bpをGENECLEAN Spin Kit(BIO 101社製)を用いて精製し、滅菌水10  $\mu$  lで溶出した(以下、アガロースゲルからのDNA断片の精製にはこの方法を用いた)。上記増幅断片4  $\mu$  lを、TOPO TA cloning Kit (Invitrogen社製)の説明書に従って、プラスミドpCR2.1へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌XL1-Blue株をコーエンらの方法

[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 69, 2110 (1972)] (以下、大腸菌の形質転換にはこの方法を用いた)により形質転換した。得られたカナマイシン耐性コロニーのうちcDNAが組み込まれた6クローンから、公知の方法[ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research), 7, 1513 (1979)] (以下、プラスミドの単離方法にはこの方法を用いる)に従って各々プラスミドDNAを単離した。

#### 【0228】

各プラスミドに挿入されたcDNAの塩基配列は、DNAシーケンサー377 (Parkin Elmer社製) およびBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer社製) を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により配列決定した全ての挿入cDNAが、チャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8 (配列番号6および7に示す) のオープンリーディングフレーム (ORF) 部分配列をコードすることを確認した。このうちPCRに伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミドDNAを選択した。以下、各プラスミドをCHFUT8-pCR2.1およびYBFUT8-pCR2.1と称す。

#### 【0229】

(3) チャイニーズハムスター $\beta$ -アクチンおよびラット $\beta$ -アクチンcDNAの取得  
チャイニーズハムスター $\beta$ -アクチンおよびラット $\beta$ -アクチンの取得は、以下の手順で行った(図13)。

まず、チャイニーズハムスター $\beta$ -アクチンゲノム配列[GenBank, U20114]およびラット $\beta$ -アクチンゲノム配列[ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research), 11, 1759, (1983)]より、翻訳開始コドンを含む共通配列に特異的なフォワードプライマー (配列番号8に示す) および翻訳終止コドンを含む各配列特異的なリバースプライマー (配列番号9および配列番号10に示す) を設計した。

#### 【0230】

次にDNAポリメラーゼKOD(東洋紡績社製)を用いて、本項(1)で調製した培養2日目のCHO細胞由来cDNAおよびYB2/0細胞由来cDNA 1 $\mu$ lを含む25 $\mu$ lの反応液[KOD buffer #1(東洋紡績社製)、0.2mmol/l dNTPs、1mmol/l MgCl<sub>2</sub>、0.4 $\mu$ mol

/1 上記遺伝子特異的プライマー(配列番号8および9、または配列番号8および10)、5% DMSO]を調製し、PCRを行った。PCRは、94℃で4分間の加熱の後、98℃で15秒間、65℃で2秒間、74℃で30秒間からなる反応を1サイクルとして、25サイクルを行った。

#### 【0231】

PCR後、反応液を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片1128bpを精製した。このDNA断片に対し、MEGALABEL(宝酒造社製)を用いて、添付の説明書に従いDNA5'末端のリン酸化を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収し、滅菌水10 $\mu$ lに溶解した。

一方、プラスミドpBluescriptII KS(+) 3 $\mu$ g (Stratagene社製)をNEBuffer 2(New England Biolabs社製) 35 $\mu$ lに溶解し、16単位の制限酵素EcoRV(宝酒造社製)を加えて37℃で3時間消化反応を行った。該反応液にpH8.0の1mol/l Tris-HCl緩衝液 35 $\mu$ lおよび大腸菌C15株由来Alkaline Phosphatase(宝酒造社製) 3.5 $\mu$ lを添加して65℃で30分間反応させることにより、DNA末端の脱リン酸化を行った。この反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理の後エタノール沈殿法を行い、回収したDNA断片を滅菌水 100 $\mu$ lに溶解した。

#### 【0232】

上記で得たチャイニーズハムスターcDNA由来増幅断片およびラットcDNA由来増幅断片(1192bp) 4 $\mu$ l、プラスミドpBluescriptII KS(+)由来のEcoRV-EcoRV断片(約3.0Kb) 1 $\mu$ l、Ligation High(東洋紡績社製) 5 $\mu$ lを混合し、16℃で30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌XL1-Blue株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。

各プラスミドに挿入されたcDNAの塩基配列は、DNAシーケンサー377 (Parkin Elmer社製) およびBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer社製) を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により配列決定した全ての挿入cDNAが、チャイニーズハムスター $\beta$ -アクチンおよびラット $\beta$ -アクチン各cDNAのORF全長配列をコードすることを確認した。このうちPCRに伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミドDNAを選択

した。以下、各プラスミドをCHAc-pBSおよびYBac-pBSと称す。

### 【0233】

#### (4) FUT8スタンダードおよび内部コントロールの調製

各細胞内のFUT8遺伝子由来mRNA転写量を測定するために、検量線に用いるスタンダードとして、本項(2)で得たチャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8の各cDNA部分断片をpCR2.1に組み込んだプラスミドであるCHFT8-pCR2.1およびYBFT8-pCR2.1を制限酵素EcoRIで切断し直鎖化したDNAを用いた。FUT8定量の内部コントロールとしては、CHFT8-pCR2.1およびYBFT8-pCR2.1のうち、チャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8の内部塩基配列のScaI-HindIII間203bpを欠失させることにより得られたCHFT8d-pCR2.1およびYBFT8d-pCR2.1を、制限酵素EcoRIで切断し直鎖化したDNAを用いた。以下にその詳細を説明する。

### 【0234】

チャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8のスタンダードの調製は次の手順で行った。プラスミドCHFT8-pCR2.1 2 $\mu$ gをNEBuffer2(New England Biolabs社製) 40 $\mu$ lに溶解し、24単位の制限酵素EcoRI(宝酒造社製)を加えて37℃で3時間消化反応を行った。一方、プラスミドYBFT8-pCR2.1 2 $\mu$ gをNEBuffer2(New England Biolabs社製) 40 $\mu$ lに溶解し、24単位の制限酵素EcoRI(宝酒造社製)を加えて37℃で3時間消化反応を行った。該反応液の一部を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8 各cDNA部分断片を含むEcoRI-EcoRI断片(約1Kb)がプラスミドCHFT8-pCR2.1およびYBFT8-pCR2.1より分離されたことを確認した。各反応液より、1 $\mu$ g/ml パン酵母由来t-RNA(SIGMA社製)を用いて0.02fg/ $\mu$ l、0.2fg/ $\mu$ l、1fg/ $\mu$ l、2fg/ $\mu$ l、10fg/ $\mu$ l、20fg/ $\mu$ l、100fg/ $\mu$ lの希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8のスタンダードとした。

### 【0235】

チャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8の内部コントロールの調製は次のように行った(図14)。DNAポリメラーゼKOD(東洋紡績社製)を用いて、CHFT8-pCR2.1およびYBFT8-pCR2.1 5ngを含む25 $\mu$ lの反応液[KOD buffer #1(東洋紡績社製)、0.2mmol/l dNTPs、1mmol/l MgCl<sub>2</sub>、0.4 $\mu$ mol/l 遺伝子特異的プライマ

ー(配列番号 1 1 および 1 2)、5% DMSO] を調製し、PCRを行った。PCRは、94℃で4分間の加熱の後、98℃で15秒間、65℃で2秒間、74℃で30秒間からなる反応を1サイクルとして、25サイクル行った。PCR後、反応液を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約4.7Kbを精製した。該DNA断片に対し、MEGALABEL(宝酒造社製)を用いて、添付の説明書に従いDNA5'末端のリン酸化を行った後、反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収し、滅菌水50 $\mu$ lに溶解した。上記で得たDNA断片(約4.7Kb) 5 $\mu$ lおよびLigation High(東洋紡績社製) 5 $\mu$ lを混合し、16℃で30分間反応させることにより自己環状化反応を行った。

#### 【 0 2 3 6 】

該反応液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。各プラスミドDNAに対しDNAシーケンサー377(Parkin Elmer社製)およびBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Parkin Elmer社製)を用いて配列決定を行い、同プラスミドに挿入されたチャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8の内部塩基配列ScaI-HindIII間203bpが欠失したことを確認した。得られた各プラスミドをCHFT8d-pCR2.1およびYBFT8d-pCR2.1と称す。

#### 【 0 2 3 7 】

次にプラスミドCHFT8d-pCR2.1 2 $\mu$ gをNEBuffer2(New England Biolabs社製) 40 $\mu$ lに溶解し、24単位の制限酵素EcoRI(宝酒造社製)を加えて37℃で3時間消化反応を行った。一方、プラスミドYBFT8d-pCR2.1 2 $\mu$ gをNEBuffer2(New England Biolabs社製) 40 $\mu$ lに溶解し、24単位の制限酵素EcoRI(宝酒造社製)を加えて37℃で3時間消化反応を行った。該反応液の一部を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8部分断片の内部塩基配列203bpが欠失した断片を含むEcoRI-EcoRI断片(約800bp)がプラスミドCHFT8d-pCR2.1およびYBFT8d-pCR2.1より分離されたことを確認した。各反応液より、1 $\mu$ g/ml パン酵母由来t-RNA(SIGMA社製)を用いて2fg/ $\mu$ lの希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8の内部コントロールとした。

#### 【 0 2 3 8 】



(5)  $\beta$ -アクチンスタンダードおよび内部コントロールの調製

各宿主細胞内の  $\beta$ -アクチン遺伝子由来 mRNA 転写量を測定するために、検量線に用いるスタンダードとして、本項 (3) で得たチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチン各 cDNA の ORF 全長を pBluescript II KS(+) に組み込んだプラスミドである CHAc-pBS および YBac-pBS を、前者は制限酵素 HindIII および PstI で、後者は制限酵素 HindIII および KpnI で、各々切断し直鎖化した DNA を用いた。 $\beta$ -アクチン定量の内部コントロールとしては、CHAc-pBS および YBac-pBS のうち、チャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンの内部塩基配列の DraIII-DraIII 間 180bp を欠失させることにより得られた CHAcΔ-pBS および YBacΔ-pBS を、前者は制限酵素 HindIII および PstI で、後者は制限酵素 HindIII および KpnI で、切断し直鎖化した DNA を用いた。以下にその詳細を説明する。

## 【 0 2 3 9 】

チャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンのスタンダードの調製は次の手順で行った。プラスミド CHAc-pBS 2  $\mu$ g を NEBuffer2 (New England Biolabs 社製) 40  $\mu$ l に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII (宝酒造社製) および 20 単位の PstI (宝酒造社製) を加えて 37℃ で 3 時間消化反応を行った。一方、プラスミド YBac-pBS 2  $\mu$ g を NEBuffer2 (New England Biolabs 社製) 40  $\mu$ l に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII (宝酒造社製) および 24 単位の KpnI (宝酒造社製) を加えて 37℃ で 3 時間消化反応を行った。該反応液の一部を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチン各 cDNA ORF 全長を含む HindIII-PstI 断片および HindIII-KpnI 断片 (約 1.2Kb) がプラスミド CHAc-pBS および YBac-pBS より分離されたことを確認した。各反応液より、1  $\mu$ g/ml パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いて 2pg/ $\mu$ l、1pg/ $\mu$ l、200fg/ $\mu$ l、100fg/ $\mu$ l、20fg/ $\mu$ l の希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンのスタンダードとした。

## 【 0 2 4 0 】

チャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンの内部コントロールの調製は次の手順で行った (図 1 5)。CHAc-pBS 2  $\mu$ g を 100ng/ $\mu$ l BSA (New

England Biolabs社製)を含むNEBuffer3(New England Biolabs社製) 100  $\mu$ lに溶解し、10単位の制限酵素DraIII(New England Biolabs)を加えて37℃で3時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収し、DNA Blunting Kit(宝酒造社製)を用い、添付の説明書に従ってDNA末端の平滑化を行った後、反応液を2等分した。まず一方の反応液には、pH8.0の1mol/l Tris-HCl緩衝液 35  $\mu$ lおよび大腸菌C15株由来Alkaline Phosphatase(宝酒造社製) 3.5  $\mu$ lを添加し、65℃で30分間反応させることによりDNA末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿法を行い、回収したDNA断片を滅菌水 10  $\mu$ lに溶解した。残る他方の反応液は0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、チャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンORF部分断片を含む約1.1KbのDNA断片を精製した。

#### 【0241】

上記で得た脱リン酸化DraIII-DraIII断片 0.5  $\mu$ l、約1.1KbのDraIII-DraIII断片 4.5  $\mu$ l、Ligation High(東洋紡績社製) 5  $\mu$ lを混合し、16℃で30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5  $\alpha$  株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。各プラスミドDNAに対しDNAシーケンサー377 (Parkin Elmer社製) およびBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer社製)を用いて配列決定を行い、同プラスミドに挿入されたチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンDraIII-DraIII間180bpが欠失したことを確認した。本プラスミドをCHAc-d-pBSと称す。

#### 【0242】

また、ラット  $\beta$ -アクチンDraIII-DraIII間180bpが欠失したプラスミドをCHAc-d-pBSと同様の工程を経て作製した。本プラスミドをYBAc-d-pBSと称す。

次にプラスミドCHAc-d-pBS 2  $\mu$ gをNEBuffer2(New England Biolabs社製) 40  $\mu$ lに溶解し、25単位の制限酵素HindIII(宝酒造社製) および20単位のPstI(宝酒造社製)を加えて37℃で3時間消化反応を行った。一方、プラスミドYBAc-d-pBS 2  $\mu$ gをNEBuffer2(New England Biolabs社製) 40  $\mu$ lに溶解し、25単位の制限酵素HindIII(宝酒造社製) および24単位のKpnI(宝酒造社製)を加えて37℃で3

時間消化反応を行った。該反応液の一部を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチン 各cDNA ORF全長の内部塩基配列180bpが欠失した断片を含むHindIII-PstI断片およびHindIII-KpnI断片（約1.0Kb）がプラスミドCHAcid-pBSおよびYB Acid-pBSより分離されたことを確認した。各反応液より、 $1\mu\text{g/ml}$  パン酵母由来t-RNA（SIGMA社製）を用いて $200\text{fg}/\mu\text{l}$ の希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンの内部コントロールとした。

#### 【0243】

##### （6）競合的PCRによる転写量の定量

本項（4）で作製したFUT8内部コントロールDNAおよび本項（1）で得た宿主細胞株由来cDNAを鋳型として競合的PCRを行い、各鋳型に由来する増幅産物量の相対値より、宿主細胞株内のFUT8の転写産物の定量値を算出した。一方、 $\beta$ -アクチン遺伝子は各細胞において恒常的に転写されており、その転写量は細胞間で同程度と考えられているため、各宿主細胞株由来cDNA合成反応の効率の目安として、 $\beta$ -アクチン遺伝子の転写量を定量した。すなわち、本項（5）で作製した  $\beta$ -アクチン内部コントロールDNAおよび本項（1）で得た宿主細胞株由来cDNAを鋳型としてPCRを行い、各鋳型に由来する増幅産物量の相対値より、宿主細胞株内の  $\beta$ -アクチンの転写産物の定量値を算出した。以下にその詳細を説明する。

#### 【0244】

FUT8の転写産物の定量は次の手順で行った。まず、本項（2）で得たチャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8 ORF部分配列の内部配列に対し、共通配列特異的なプライマーセット（配列番号13および14に示す）を設計した。次に、本項（1）で得た各宿主細胞株由来のcDNA溶液の50倍希釈液 $5\mu\text{l}$ および内部コントロール用プラスミド $5\mu\text{l}$ （10fg）を含む総体積 $20\mu\text{l}$ の反応液[ExTaq buffer（宝酒造社製）、 $0.2\text{mmol/l}$  dNTPs、 $0.5\mu\text{mol/l}$  上記遺伝子特異的プライマー（配列番号13および14）、5% DMSO]で、DNAポリメラーゼExTaq（宝酒造社製）を用いてPCRを行った。PCRは、 $94^{\circ}\text{C}$ で3分間の加熱の後、 $94^{\circ}\text{C}$ で1分間、 $60^{\circ}\text{C}$ で1分間、 $72^{\circ}\text{C}$ で1分間からなる反応を1サイクルとして32サイクル行った。

#### 【0245】

また、各宿主細胞株由来cDNAに代えて、本項（４）で得たFUT8スタンダードプラスミド  $5\mu\text{l}$  (0.1fg、1fg、5fg、10fg、50fg、100fg、500fg、1pg) を添加した系でPCRを行い、FUT8転写量の検量線作製に用いた。

$\beta$ -アクチンの転写産物の定量は次の手順で行った。まず、本項（３）で得たチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンORF全長の内部配列に対し、各遺伝子特異的なプライマーセット（前者を配列番号 15 および配列番号 16 に、後者を配列番号 17 および配列番号 18 に示す）をそれぞれ設計した。

次に、本項（１）で得られた各宿主細胞株由来のcDNA溶液の50倍希釈液  $5\mu\text{l}$  および内部コントロール用プラスミド  $5\mu\text{l}$  (1pg) を含む総体積  $20\mu\text{l}$  の反応液[ExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5  $\mu\text{mol/l}$  上記遺伝子特異的プライマー（配列番号 15 および配列番号 16、または配列番号 17 および配列番号 18）、5% DMSO]で、DNAポリメラーゼExTaq(宝酒造社製)を用いてPCRを行った。PCRは、94℃で3分間の加熱の後、94℃で30秒間、65℃で1分間、72℃で2分間から成る反応を1サイクルとした17サイクルの条件で行った。

#### 【0246】

また、各宿主細胞株由来cDNAに代えて、本項（５）で得た  $\beta$ -アクチンスタンダードプラスミド  $5\mu\text{l}$  (10pg、5pg、1pg、500fg、100fg) を添加した系でPCRをそれぞれ行い、 $\beta$ -アクチン転写量の検量線作製に用いた。

#### 【0247】

【表 3】

第 3 表

ターゲット 遺伝子	*プライマーセット	PCR増幅産物のサイズ (bp)	
		ターゲット	コンペティター
FUT8	F: 5' -GTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGG-3' R: 5' -CACCAATGATATCTCCAGGTTCC-3'	638	431
$\beta$ -actin (チャイニーズハムスター)	F: 5' -GATATCGCTGCGCTCGTTGTCGAC-3' R: 5' -CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGAGC-3'	789	609
$\beta$ -actin (ラット)	F: 5' -GATATCGCTGCGCTCGTCGTCGAC-3' R: 5' -CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGAGC-3'	789	609

\*F: フォワードプライマー、R: リバースプライマー

## 【0248】

第3表に記載のプライマーセットを用いたPCRにより、各遺伝子転写産物および各スタンダードから第3表のターゲット欄に示したサイズのDNA断片を、各内部コントロールから第3表のコンペティター欄に示したサイズのDNA断片を増幅させることができる。

PCR後の溶液のうち、7 $\mu$ lを1.75%アガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを1倍濃度のSYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes社製) に30分間浸漬し染色した。増幅された各DNA断片の発光強度をフルオロイメジャー (FluorImager SI; Molecular Dynamics社製) で算出することにより、増幅されたDNA断片の量を測定した。

## 【0249】

上記の方法により、スタンダードプラスミドを鋳型としたPCRによって生じた増幅産物量を測定し、その測定値とスタンダードプラスミド量をプロットして検量線を作成した。この検量線を用いて、各発現株由来全cDNAを鋳型とした場合の増幅産物の量より各株中の目的遺伝子cDNA量を算出し、これを各株におけるmRNA転写量とした。

ラットFUT8配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合の各宿主細胞株におけるFUT8転写産物の量を図16に示した。培養期間を通じてCHO細胞株はY

B2/0細胞株の10倍以上の転写量を示した。この傾向は、チャイニーズハムスターFUT8配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合にも認められた。

また、第4表に $\beta$ -actin転写産物の量との相対値としてFUT8転写量を示した。培養期間を通じてYB2/0細胞株のFUT8転写量が $\beta$ -actinの0.1%前後であるのに対し、CHO細胞株は0.5%~2%であった。

以上の結果より、YB2/0細胞株のFUT8転写産物量はCHO細胞株のそれよりも有意に少ないことが示された。

【0250】

【表4】

第4表

細胞株	培養日数				
	Day1	Day2	Day3	Day4	Day5
CHO	1.95	0.90	0.57	0.52	0.54
YB2/0	0.12	0.11	0.14	0.08	0.07

【0251】

実施例9. 抗ガングリオシドGD3キメラ抗体生産細胞株における $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ(FUT8)遺伝子の転写物の定量

(1) 各種生産細胞株由来一本鎖cDNAの調製

抗ガングリオシドGD3キメラ抗体生産細胞DCHI01-20株および61-33株より、以下の手順で一本鎖cDNAを調製した。DCHI01-20株は、実施例1第2項(2)記載のCHO/DG44細胞由来の形質転換クローンである。また61-33株は、YB2/0由来の形質転換細胞7-9-51株[工業技術院生命工業技術研究所, FERM BP-6691]に対し無血清馴化を行った後、2回の限界希釈法による単細胞化を行って得たクローンである。

【0252】

DCHI01-20株を3mmol/l L-グルタミン (Life Technologies社製)、0.3% PLURONIC F-68 (Life Technologies社製) および0.5% 脂肪酸濃縮液 (Life Technologies社製) を添加したEXCELL302培地 (JRH BIOSCIENCES社製) に懸濁し、 $2 \times 10^5$ 個/mlの密度で浮遊細胞培養用T75フラスコ (Greiner社製) に15ml播種した。また、61-33株を0.2% ウシ血清アルブミンフラクションV (Life Technologie社製) (以下、BSAと略記する) を添加したHybridoma-SFM培地 (Life Technologie社製) に懸濁し、 $2 \times 10^5$ 個/mlの密度で浮遊細胞培養用T75フラスコ (Greiner社製) に15ml播種した。これらを37℃の5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養し、培養1日目、2日目、3日目、4日目および5日目に各宿主細胞 $1 \times 10^7$ 個を回収し、RNAeasy (QIAGEN社製) により添付の説明書に従って全RNAを抽出した。

### 【0253】

全RNAを45 $\mu$ lの滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega社製) 1 $\mu$ l、付属の10 $\times$ DNase buffer 5 $\mu$ l、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega社製) 0.5 $\mu$ lをそれぞれに添加して、37℃で30分間反応させることにより、試料中に混入したゲノムDNAを分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN社製) により全RNAを再精製し、50 $\mu$ lの滅菌水に溶解した。

得られた全RNA 3 $\mu$ gに対し、SUPERScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ(dT)をプライマーとした20 $\mu$ lの系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖cDNAを合成した。該反応液を水で50倍希釈し、使用するまで-80℃で保管した。

### 【0254】

#### (2) 競合的PCRによる各遺伝子転写量の定量

本項(1)で得た抗体生産細胞株由来cDNAに対し、実施例8(5)に準じて競合的PCRによる各遺伝子転写量の定量を行った。

各生産細胞株内のFUT8遺伝子由来のmRNA転写量の定量は、以下の手順で行った。

FUT8転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例8(2)で得たチャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8のcDNA部分断片をpCR2.1に組

み込んだプラスミドであるCHFT8-pCR2.1およびYBFT8-pCR2.1を制限酵素EcoRIで切断し直鎖化したDNAを用いた。

FUT8定量の内部コントロールとしては、実施例8(4)で調製したCHFT8d-pCR2.1およびYBFT8d-pCR2.1のうち、チャイニーズハムスターFUT8およびラットFUT8の内部塩基配列のScaI-HindIII間203bpを欠失させることにより得られたCHFT8d-pCR2.1およびYBFT8d-pCR2.1を、制限酵素EcoRIで切断し直鎖化したDNAを用いた。

#### 【0255】

本項(1)で得た各生産細胞株由来のcDNA溶液の50倍希釈液 5  $\mu$ l および内部コントロール用プラスミド 5  $\mu$ l (10fg) を含む総体積20  $\mu$ l の反応液[ExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5  $\mu$ mol/l FUT8遺伝子特異的プライマー(配列番号13および14)、5% DMSO]で、DNAポリメラーゼExTaq(宝酒造社製)を用いてPCRを行った。PCRは、94℃で3分間の加熱の後、94℃で1分間、60℃で1分間、72℃で1分間からなる反応を1サイクルとして32サイクル行った。

#### 【0256】

また、各生産細胞株由来cDNAに代えて、FUT8スタンダードプラスミド 5  $\mu$ l (0.1fg、1fg、5fg、10fg、50fg、100fg、500fg、1pg) を添加した系でPCRを行い、FUT8転写量の検量線作製に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には1  $\mu$ g/ml パン酵母由来t-RNA (SIGMA社製)を用いた。

一方、 $\beta$ -アクチン遺伝子は各細胞において恒常的に転写されており、その転写量は細胞間で同程度と考えられているため、各生産細胞株由来cDNA合成反応の効率の目安として、 $\beta$ -アクチン遺伝子の転写量を以下の手順で定量した。

$\beta$ -アクチン遺伝子転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例8(3)で調製したチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンのcDNAのORF全長をpBluescriptII KS(+)に組み込んだプラスミドであるCHAc-pBSおよびYBAc-pBSを制限酵素HindIIIおよびKpnIで切断し直鎖化したDNAを用いた。

#### 【0257】

$\beta$ -アクチン定量の内部コントロールとしては、実施例8(5)で調製した、CHAc-pBSおよびYBAc-pBSのうちチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット



$\beta$ -アクチンの内部塩基配列のDraIII-DraIII間180bpを欠失させることにより得られたCHAc-d-pBSおよびYBAc-d-pBSを、制限酵素HindIIIおよびKpnIで切断し直鎖化したDNAを用いた。

#### 【0258】

上記で得た各生産細胞株由来のcDNA溶液の50倍希釈液 5  $\mu$ lおよび内部コントロール用プラスミド 5  $\mu$ l (1 pg) を含む総体積20  $\mu$ lの反応液[ExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5  $\mu$ mol/l  $\beta$ -アクチン特異的プライマー(配列番号17および18)、5% DMSO]で、DNAポリメラーゼExTaq(宝酒造社製)を用いてPCRを行った。PCRは、94℃で3分間の加熱の後、94℃で30秒間、65℃で1分間、72℃で2分間から成る反応を1サイクルとした17サイクルの条件で行った。また、各生産細胞株由来cDNAに代えて、 $\beta$ -アクチンスタンダードプラスミド10pg、5pg、1pg、500fg、100fgを添加した系でPCRをそれぞれ行い、 $\beta$ -アクチン転写量の検量線作製に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には1  $\mu$ g/ml パン酵母由来t-RNA (SIGMA社製)を用いた。

#### 【0259】

第3表に記載のプライマーセットを用いたPCRにより、各遺伝子転写産物および各スタンダードから第3表のターゲット欄に示したサイズのDNA断片を、各内部コントロールから第3表のコンペティター欄に示したサイズのDNA断片を増幅させることができる。

PCR後の溶液のうち、7  $\mu$ lを1.75%アガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを1倍濃度のSYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes社製)に30分間浸漬し染色した。増幅された各DNA断片の発光強度をフルオロイメジャー (FluorImager SI; Molecular Dynamics社製)で算出することにより、増幅されたDNA断片の量を測定した。

#### 【0260】

上記の方法により、スタンダードプラスミドを鋳型としたPCRによって生じた増幅産物量を測定し、その測定値とスタンダードプラスミド量をプロットして検量線を作成した。この検量線を用いて、各生産細胞株由来全cDNAを鋳型とした場合の増幅産物の量より各株中の目的遺伝子cDNA量を算出し、これを各株における

mRNA転写量とした。

【0261】

第5表に $\beta$ -actin転写産物の量との相対値としてFUT8転写量を示した。培養期間を通じて、YB2/0細胞由来抗体生産株61-33のFUT8転写量が $\beta$ -actinの0.3%以下であるのに対し、CHO細胞由来抗体生産株DCHI01-20は0.7~1.5%であった。この結果より、YB2/0細胞由来抗体生産株のFUT8転写産物量はCHO細胞由来抗体生産株のそれよりも有意に少ないことが示された。

【0262】

【表5】

第 5 表					
培養日数					
細胞株	Day1	Day2	Day3	Day4	Day5
DCHI01-20	0.75	0.73	0.99	1.31	1.36
61-33	0.16	0.19	0.24	0.30	<0.10

【0263】

実施例10. マウス $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株の作製

(1) マウス $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 発現プラスミドの構築

10% ウシ胎児血清 (Life Technologie社製) を含むIMDM培地 (Life Technologie社製) で継代培養したマウスミエローマNS0細胞 (理化学研究所セルバンク, RCB0213)  $1 \times 10^7$  個に対し、RNAeasy (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い全RNAを抽出した。全RNAを45 $\mu$ lの滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega社製) 1 $\mu$ l、付属の10 $\times$ DNase buffer 5 $\mu$ l、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega社製) 0.5 $\mu$ lを添加して、37℃で30分間反応させることにより、

試料中に混入したゲノムDNAを分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN社製) により全RNAを再精製し、50  $\mu$  lの滅菌水に溶解した。得られた全RNAのうち3  $\mu$  gに対し、SUPERScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ(dT)をプライマーとした20  $\mu$  lの系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖cDNAを合成した。

#### 【 0 2 6 4 】

マウスFUT8 cDNAの取得は以下の手順で行った (図 1 7) 。

まず、マウスFUT8のcDNA配列 [GenBank, AB025198] より、翻訳開始コドンを含む配列に特異的なフォワードプライマー (配列番号 1 9 に示す) および翻訳終止コドンを含む配列特異的なリバースプライマー (配列番号 2 0 に示す) を設計した。

次にDNAポリメラーゼExTaq (宝酒造社製) を用いて、前述のNS0細胞由来cDNA 1  $\mu$  lを含む25  $\mu$  lの反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製) 、0.2mmol/l dNTPs、4% DMSO、0.5  $\mu$  mol/l 上記特異的プライマー (配列番号 1 9 および配列番号 2 0) ] を調製し、PCRを行った。PCRは、94℃で1分間の加熱の後、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして30サイクルの後、さらに72℃で10分間加熱する条件で行った。

#### 【 0 2 6 5 】

PCR後、反応液を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片1728bpを精製した。このDNA断片 4  $\mu$  lを、TOPO TA cloning Kit (Invitrogen社製) の説明書に従って、プラスミドpCR2.1へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌DH5  $\alpha$  株を形質転換した。得られたカナマイシン耐性コロニーのうちcDNAが組み込まれた6クローンから、公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。

#### 【 0 2 6 6 】

各プラスミドに挿入されたcDNAの塩基配列は、DNAシーケンサー377 (Parkin Elmer社製) およびBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer社製) を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により配列決定した全ての挿入cDNAが、マウスFUT8のORF全長配列をコードすることを確認した。このうちPCRに伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まな

いプラスミドDNAを選択した（そのDNA配列を配列番号2に示す。また、そのアミノ酸配列を配列番号24に示す）。尚、本配列には、前述のGenBank上に登録されたマウスFUT8配列とはアミノ酸置換を伴う3塩基の不一致があった。以下、本プラスミドをmfFUT8-pCR2.1と称す。

#### 【0267】

続いて、マウスFUT8 ORF全長配列を含むプラスミドpBSmfFUT8の構築を以下のように行った（図18）。まず、プラスミドpBluescriptII KS(+) 1 $\mu$ gを(Stratagene社製)をNEBuffer2(New England Biolabs社製) 35 $\mu$ lに溶解し、制限酵素EcoRI(宝酒造社製) 20単位を加えて37℃で2時間消化反応を行った。該反応液にpH8.0の1mol/l Tris-HCl緩衝液 35 $\mu$ lおよび大腸菌C15株由来Alkaline Phosphatase(宝酒造社製) 3.5 $\mu$ lを添加して65℃で30分間反応させることにより、DNA末端の脱リン酸化を行った。この反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理の後エタノール沈殿法を行い、回収したDNA断片を滅菌水 10 $\mu$ lに溶解した。

#### 【0268】

一方、プラスミドmfFUT8-pCR2.1 1 $\mu$ gを(Stratagene社製)をNEBuffer2(New England Biolabs社製) 35 $\mu$ lに溶解し、20単位の制限酵素EcoRI(宝酒造社製)を加えて37℃で2時間消化反応を行った。該反応液を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、マウスFUT8 cDNA ORF全長を含む約1.7KbのDNA断片を精製した。

上記で得たプラスミドpBluescriptII KS(+)由来のEcoRI-EcoRI断片(2.9Kb) 1 $\mu$ l、プラスミドmfFUT8-pCR2.1由来のEcoRI-EcoRI断片(1.7Kb) 4 $\mu$ l、Ligation High(東洋紡績社製) 5 $\mu$ lを混合し、16℃で30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。本プラスミドを以下、pBSmfFUT8と称す。

#### 【0269】

上記pBSmfFUT8およびpAGE249を用いて、マウスFUT8発現ベクターpAGEmfFUT8の構築を以下の手順で行った（図19）。pAGE249は、pAGE248 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 269, 14730 (1994)] の誘導体であり、pAGE248よりジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(dhfr)発現ユニットを

含むSphI-SphI断片 (2.7Kb) を除去したベクターである。

pAGE249 1 $\mu$ gをUniversel BufferH(宝酒造社製) 50 $\mu$ lに溶解し、20単位の制限酵素SalI(New England Biolabs社製) を加えて37℃で2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、NEBuffer2(New England Biolabs社製) 35 $\mu$ lに溶解し、20単位の制限酵素BamHI(New England Biolabs社製) を加えて37℃で2時間消化反応を行った。消化反応後、該液にpH8.0の1mol/l Tris-HCl緩衝液 35 $\mu$ lおよび大腸菌C15株由来Alkaline Phosphatase(宝酒造社製) 3.5 $\mu$ lを添加して65℃で30分間反応させることにより、DNA末端の脱リン酸化を行った。この反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理の後エタノール沈殿法を行い、回収したDNA断片を滅菌水 10 $\mu$ lに溶解した。

#### 【 0 2 7 0 】

一方、pBSmfFUT8 1 $\mu$ gをUniversel BufferH(宝酒造社製) 50 $\mu$ lに溶解し、20単位の制限酵素SalI(New England Biolabs社製) を加えて37℃で2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、NEBuffer2(New England Biolabs社製) 35 $\mu$ lに溶解し、20単位の制限酵素BamHI(New England Biolabs社製) を加えて37℃で2時間消化反応を行った。消化反応後、該液を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、マウスFUT8 cDNA ORF全長を含む約1.7KbのDNA断片を精製した。

#### 【 0 2 7 1 】

上記で得たプラスミドpAGE249由来のBamHI-SalI断片(6.5Kb) 1 $\mu$ l、プラスミドpBSmfFUT8由来のBamHI-SalI断片(1.7Kb) 4 $\mu$ l、Ligation High(東洋紡績社製) 5 $\mu$ lを混合し、16℃で30分間反応させることにより結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。本プラスミドを以下、pAGEmfFUT8と称す。

#### 【 0 2 7 2 】

(2) マウス $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株の作製

本項 (1) で構築したマウスFUT8発現ベクターpAGEmfFUT8を61-33株へ導入し

、FUT8遺伝子の安定的発現株を取得した。上記61-33株は、抗ガングリオシドGD3キメラ抗体を高生産するYB2/0細胞由来の形質転換細胞7-9-51株〔工業技術院生命工業技術研究所, FERM BP-6691〕に対し無血清馴化を行った後、2回の限界希釈法による単一細胞化を行って得たクローンである。

#### 【 0 2 7 3 】

プラスミドpAGEmfFUT8の61-33株への遺伝子導入はエレクトロポレーション法〔サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)〕に準じて以下の手順で行った。まず、プラスミドpAGEmfFUT8 30  $\mu$ gをNEBuffer4(New England Biolabs社製) 600  $\mu$ lに溶解し、100単位の制限酵素FspI(New England Biolabs社製)を加えて37℃で2時間消化反応を行うことにより線状化した。該反応液に対しエタノール沈殿法を行い、回収した線状化プラスミドを1  $\mu$ g/ $\mu$ l水溶液とした。次に、61-33株をK-PBS緩衝液〔137mmol/l KCl、2.7mmol/l NaCl、8.1mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.5mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、4.0mmol/l MgCl<sub>2</sub>〕に懸濁して2 $\times$ 10<sup>7</sup>個/mlとし、細胞懸濁液200  $\mu$ l (4 $\times$ 10<sup>6</sup>個)を上記線状化プラスミド 10  $\mu$ l (10  $\mu$ g)と混和した。細胞-DNA混和液をGene Pulser Cuvette(電極間距離2mm) (BIO-RAD社製)へ移した後、細胞融合装置Gene Pulser(BIO-RAD社製)を用いてパルス電圧0.2KV、電気容量250  $\mu$ Fの条件で遺伝子導入を行った。この細胞懸濁液を5% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie社製) および0.2% BSA (Life Technologie社製)を添加したHybridoma-SFM培地 (Life Technologie社製) 10mlに混和し、浮遊細胞用96穴プレート (Greiner社製)に100  $\mu$ lずつ分注した。5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で24時間培養した後、培養上清50  $\mu$ lを除去し、0.5mg/ml Hygromycin B (和光純薬工業社製)、5% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie社製) および0.2% BSA (Life Technologie社製)を添加したHybridoma-SFM培地 (Life Technologie社製)を100  $\mu$ lずつ分注した。この培地交換作業を3~4日毎に繰り返しながら3週間の培養を行い、ハイグロマイシン耐性を示す14株を取得した。

#### 【 0 2 7 4 】

一方、pAGEmfFUT8の母骨格ベクターであるプラスミドpAGE249を61-33株へ導入することにより、ネガティブコントロール株を作製した。上述の手順で、制限酵素FspIにより線状化したプラスミドpAGE249 10  $\mu$ gをエレクトロポレーション法

を用いて61-33株  $4 \times 10^6$  cellsへ遺伝子導入した。該細胞を5% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie社製) および0.2% BSA (Life Technologie社製) を添加したHybridoma-SFM培地 (Life Technologie社製) 15mlに混和した後、浮遊細胞用T75フラスコ (Greiner社製) に移し入れ、5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で24時間培養した。培養後、800rpmで4分間の遠心分離を行い、上清の半量 (7.5ml) を除去した後、0.5mg/ml Hygromycin B (和光純薬工業社製)、5% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie社製) および0.2% BSA (Life Technologie社製) を添加したHybridoma-SFM培地 (Life Technologie社製) 7.5mlを添加して懸濁し、浮遊細胞用T75フラスコ (Greiner社製) に移し入れた。この培地交換作業を3~4日毎に繰り返しながら3週間の培養を行い、ハイグロマイシン耐性株を取得した。

#### 【0275】

(3) マウス  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株における該遺伝子発現量の解析

本項(2)で作製した61-33株由来マウスFUT8過剰発現株14株より任意に選択した6株およびネガティブコントロール株に対し、競合的RT-PCRを用いてFUT8発現量の比較を行った。

上記過剰発現株を0.5mg/ml Hygromycin B (和光純薬工業社製)、5% ウシ胎児透析血清 (Life Technologie社製) および0.2% BSA (Life Technologie社製) を添加したHybridoma-SFM培地 (Life Technologie社製) に懸濁し、 $3 \times 10^5$  個/mlの密度で浮遊細胞培養用T75フラスコ (Greiner社製) に15ml播種した。37℃、5% CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養した後、生細胞 $1 \times 10^7$  個を回収し、RNAeasy (QIAGEN社製) を用いて添付の説明書に従い全RNAを抽出した。全RNAを45  $\mu$  lの滅菌水に溶解し、RQ1 Rnase-Free DNase (Promega社製) 0.5U/ $\mu$  l、付属の10 $\times$ DNase buffer 5  $\mu$  l、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega社製) 0.5  $\mu$  lを添加して37℃で30分間反応させることにより、試料中に混入したゲノムDNAを分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN社製) により全RNAを再精製し、50  $\mu$  lの滅菌水に溶解した。

#### 【0276】

得られた全RNA 2.5  $\mu$  gに対し、SUPERScript™ Preamplification System for F

irst Strand cDNA Synthesis (Life Technologies社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ(dT)をプライマーとした20 $\mu$ lの系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖cDNAを合成した。該反応液を水で50倍希釈し、実施例8(5)に準じて競合的PCRによる各遺伝子転写量の定量に供した。

各発現株内のFUT8遺伝子由来のmRNA転写量の定量は、以下の手順で行った。FUT8転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例8(2)で調製したラットFUT8のcDNA部分断片をpCR2.1に組み込んだプラスミドであるYBFT8-pCR2.1を制限酵素EcoRIで切断し直鎖化したDNAを用いた。

#### 【0277】

FUT8定量の内部コントロールとしては、実施例8(4)で調製したYBFT8-pCR2.1のうち、ラットFUT8の内部塩基配列のScaI-HindIII間203bpを欠失させることにより得られたYBFT8d-pCR2.1を、制限酵素EcoRIで切断し直鎖化したDNAを用いた。

上記で得た各発現株由来のcDNA溶液の50倍希釈液 5 $\mu$ lおよび内部コントロール用プラスミド 5 $\mu$ l (10fg) を含む総体積20 $\mu$ lの反応液[ExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5 $\mu$ mol/l ラットFUT8遺伝子特異的プライマー(配列番号13および14)、5% DMSO]で、DNAポリメラーゼExTaq(宝酒造社製)を用いてPCRを行った。PCRは、94℃で3分間の加熱の後、94℃で1分間、60℃で1分間、72℃で1分間からなる反応を1サイクルとして32サイクル行った。

#### 【0278】

また、各発現株由来cDNAに代えて、FUT8スタンダードプラスミド 5 $\mu$ l (0.1fg、1fg、5fg、10fg、50fg、100fg、500fg、1pg) を添加した系でPCRを行い、FUT8転写量の検量線作製に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には1 $\mu$ g/ml パン酵母由来t-RNA (SIGMA社製)を用いた。

一方、 $\beta$ -アクチン遺伝子は各細胞において恒常的に転写されており、その転写量は細胞間で同程度と考えられているため、各発現株由来cDNA合成反応の効率の目安として、 $\beta$ -アクチン遺伝子の転写量を以下の手順で定量した。

$\beta$ -アクチン遺伝子転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例8(3)で調製したラット $\beta$ -アクチンのcDNAのORF全長をpBluescriptII



KS(+)に組み込んだプラスミドであるYBac-pBSを制限酵素HindIIIおよびKpnIで切断し直鎖化したDNAを用いた。

$\beta$ -アクチン定量の内部コントロールとしては、実施例 8 (5) で調製したYBac-pBSのうちラット  $\beta$ -アクチンの内部塩基配列のDraIII-DraIII間180bpを欠失させることにより得られたYBacd-pBSを制限酵素HindIIIおよびKpnIで切断し直鎖化したDNAを用いた。

#### 【0279】

上記で得た各発現株由来のcDNA溶液の50倍希釈液 5  $\mu$ lおよび内部コントロール用プラスミド 5  $\mu$ l (1 pg) を含む総体積20  $\mu$ lの反応液[ExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、0.5  $\mu$ mol/l ラット  $\beta$ -アクチン特異的プライマー (配列番号 17 および 18)、5% DMSO]で、DNAポリメラーゼExTaq(宝酒造社製)を用いてPCRを行った。PCRは、94℃で3分間の加熱の後、94℃で30秒間、65℃で1分間、72℃で2分間から成る反応を1サイクルとした17サイクルの条件で行った。

また、各発現株由来cDNAに代えて、 $\beta$ -アクチンスタンダードプラスミド10pg、5 pg、1pg、500fg、100fgを添加した系でPCRをそれぞれ行い、 $\beta$ -アクチン転写量の検量線作製に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には1  $\mu$ g/ml パン酵母由来t-RNA (SIGMA社製)を用いた。

#### 【0280】

第3表に記載のプライマーセットを用いたPCRにより、各遺伝子転写産物および各スタンダードから第3表のターゲット欄に示したサイズのDNA断片を、各内部コントロールから第3表のコンペティター欄に示したサイズのDNA断片を増幅させることができる。

PCR後の溶液のうち、7  $\mu$ lを1.75%アガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを1倍濃度のSYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes社製) に30分間浸漬し染色した。増幅された各DNA断片の発光強度をフルオロイメジャー (FluorImager SI; Molecular Dynamics社製) で算出することにより、増幅されたDNA断片の量を測定した。

上記の方法により、スタンダードプラスミドを鋳型としたPCRによって生じた

増幅産物量を測定し、その測定値とスタンダードプラスミド量をプロットして検量線を作成した。この検量線を用いて、各発現株由来全cDNAを鋳型とした場合の増幅産物の量より各株中の目的遺伝子cDNA量を算出し、これを各株におけるmRNA転写量とした。

#### 【0281】

図20に $\beta$ -actin転写産物の量との相対値としてFUT8転写量を示した。mfFUT8-1、mfFUT8-2、mfFUT8-4の3株およびpAGE249導入株は、FUT8転写量が $\beta$ -actin転写量の0.3~10%であり、FUT8転写量が比較的低い株であった。一方、mfFUT8-3、mfFUT8-6、mfFUT8-7の3株は、FUT8転写量が $\beta$ -actin転写量の20~40%であり、FUT8発現量が比較的高い株であった。

#### 【0282】

(4) マウス $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株が産生する抗体の精製

本項(2)で得たFUT8遺伝子過剰発現株6株およびネガティブコントロール株1株を、200nmol/l MTX、0.5mg/ml Hygromycin B (和光純薬工業社製)、および0.2% BSA (Life Technologie社製)を添加したHybridoma-SFM培地 (Life Technologie社製)に懸濁し、 $2 \times 10^5$ 個/mlの密度で浮遊細胞培養用T225フラスコ (IWAKI社製)3本に計100ml各々播種した。これらを37℃の5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内で7~9日間培養後、生細胞数をカウントしてバイアビリティが同程度(各々30%以下)であることを確認した後、各細胞懸濁液を回収した。該細胞懸濁液に対し3000rpm、4℃の条件で10分間の遠心分離を行って上清を回収し、10000rpm、4℃の条件で1時間の遠心分離を行った後、0.22 $\mu$ m孔径150ml容PES Filter Unit (NALGENE社製)を用いて濾過した。

#### 【0283】

0.8cm径のカラムにProsep-A HighCapacity(bioPROCESSING社製)を厚さ2cmで充填し、0.1mol/l クエン酸緩衝液 (pH3.0) 10mlおよび1mol/l グリシン/NaOH-0.15mol/l NaCl緩衝液 (pH8.6) 10mlで順次洗浄することによって担体の平衡化を行った。次に、上記培養上清 各100mlをカラムに通筒し、1mol/l グリシン/NaOH-0.15mol/l NaCl緩衝液 (pH8.6) 50mlで洗浄した。洗浄後、0.1mol/l クエ

ン酸緩衝液 (pH3.0) 2.5mlを用いてProsep-Aに吸着した抗体の溶出を行い、溶出液を500 $\mu$ lずつ分画すると共に、各画分をそれぞれ2mol/l Tris-HCl(pH8.5) 100 $\mu$ lと混合して中和した。BCA法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 150, 76 (1985)] を用いて抗体を高濃度で含む2画分 (計1.2ml) を選択して合一し、10mol/l クエン酸緩衝液 (pH6.0) を用いて4℃で一昼夜透析を行った。透析後、抗体溶液を回収し、0.22 $\mu$ m孔径Millex GV (MILLIPORE社製) を用いて滅菌濾過した。

#### 【0284】

(5) マウス  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子過剰発現株が産生する抗体のin vitro細胞傷害活性 (ADCC活性)

本項 (4) で精製した抗GD3抗体のin vitro細胞傷害活性を評価するため、GD3陽性細胞であるヒトメラノーマ培養細胞株G-361 [理化学研究所セルバンク, RCB0991] を用いてADCC活性を測定した。

10% ウシ胎児血清 (Life Technologie社製) を含むRPMI1640培地 (Life Technologie社製) (以下、RPMI1640-FBS(10)と略記する) で継代培養したG-361細胞  $1 \times 10^6$ 個をRPMI1640-FBS(10) 500 $\mu$ lに懸濁し、 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  3.7MBqを添加して37℃で30分間培養することにより、細胞の放射標識を行った。1200rpmで5分の遠心分離を行った後、上清を除去し、標識細胞をRPMI1640-FBS(10) 5mlに懸濁した。この洗浄操作を3回繰り返した後、細胞懸濁液を氷上で30分間静置して放射性物質を自然解離させた。再び上記の洗浄操作を2回繰り返した後、RPMI1640-FBS(10) 5mlに懸濁することにより、 $2 \times 10^5$ 個/mlの標的細胞懸濁液を調製した。

#### 【0285】

一方、健常人の静脈血 30mlを採取し、ヘパリンナトリウム (清水製薬社製) 0.5mlを加えて穏やかに混和した後、生理的食塩水 (大塚製薬社製) 30mlと混合した。混合後、各10mlをそれぞれLymphoprep (NYCOMED PHARMA AS社製) 4ml上に穏やかに重層し、室温下2000rpmで30分間の遠心分離を行った。分離された単核球画分を各遠心管より集めて合一し、RPMI1640-FBS(10) 30mlに懸濁した。室温下1200rpmで15分の遠心分離を行った後、上清を除去し、該細胞をRPMI1640-FBS(10) 20mlに懸濁した。この洗浄操作を2回繰り返した後、RPMI1640-FBS(10)を用

いて $2 \times 10^6$ 個/mlのエフェクター細胞懸濁液を調製した。

#### 【0286】

96穴U字底プレート（Falcon社製）の各穴に標的細胞懸濁液を $50 \mu\text{l}$ ずつ（ $1 \times 10^4$ 個/穴）分注した。続いて各穴にエフェクター細胞懸濁液を $100 \mu\text{l}$ ずつ（ $2 \times 10^5$ 個/穴）分注することにより、エフェクター細胞と標的細胞の比を20:1とした。次に10M クエン酸緩衝液（pH6.0）を用いて、本項（4）で得た各種抗GD3抗体より $0.01 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 、 $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$ の希釈系列を調製し、該希釈溶液を各ウェルに $50 \mu\text{l}$ 添加することにより、終濃度 $0.0025 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.025 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.25 \mu\text{g/ml}$ 、 $2.5 \mu\text{g/ml}$ とした。5%  $\text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$ の条件下で4時間反応させた後、プレートに対し1200rpmで5分の遠心分離を行った。各穴の上清 $50 \mu\text{l}$ を12mm径RIAチューブ（IWAKI社製）に分取し、MINAX- $\gamma$  オートガンマカウンター5550（PAC KRD社製）を用いて解離 $^{51}\text{Cr}$ 量の測定を行った。

#### 【0287】

また、エフェクター細胞懸濁液および抗体溶液に代えてRPMI1640-FBS(10)  $150 \mu\text{l}$ を添加した系で上記の反応を行うことにより、自然解離 $^{51}\text{Cr}$ 量の値を求めた。さらにエフェクター細胞懸濁液および抗体溶液に代えて1規定 塩酸  $100 \mu\text{l}$ およびRPMI1640-FBS(10)  $50 \mu\text{l}$ を添加した系で上記の反応を行うことにより、全解離 $^{51}\text{Cr}$ 量の値を求めた。これらの値を用いて上記式（1）により、ADCC活性を求めた。

#### 【0288】

図21に各種抗GD3抗体のG-361細胞に対するADCC活性を示した。図20においてFUT8発現量が低かったmfFUT8-1、mfFUT8-2、mfFUT8-4の3株は、ネガティブコントロールであるpAGE249株導入株と同等の高いADCC活性を示した。一方、図21においてFUT8発現量が高かったmfFUT8-3、mfFUT8-6、mfFUT8-7の3株は、CHO細胞より取得した抗GD3抗体と同等の低いADCC活性を示した。以上の結果より、宿主細胞のFUT8発現量を調節することにより、産生抗体のADCC活性を調節し得ることが示めされた。

#### 【0289】

(6) マウス  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）遺伝子過剰発現株が産

## 生する抗体の糖鎖解析

本項(4)で精製した抗GD3抗体の糖鎖解析を行った。mfFUT8-6、pAGE249株導入株が産生する抗体のヒドラジン分解を行い、糖鎖をタンパク質から切断した[メソッド・オブ・エンザイモロジー (Method of Enzymology), 83, 263, 1982]。減圧留去することによってヒドラジンを除去した後、酢酸アンモニウム水溶液と無水酢酸加えてN-アセチル化を行った。凍結乾燥後、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った[ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 95, 197, 1984]。蛍光標識した糖鎖群(PA化糖鎖群)を、Surperdex Peptide HR 10/30カラム(Pharmacia社製)を用いて過剰な試薬と分離した。糖鎖画分を遠心濃縮機にて乾固させ、精製PA化糖鎖群とした。次に、CLC-ODSカラム(Shimadzu社製)を用いて、精製PA化糖鎖群の逆相HPLC分析を行った(図23)。ピーク面積から計算すると、mfFUT8-6の $\alpha$ -1,6-フコースのない糖鎖含量は10%、 $\alpha$ -1,6-フコース結合糖鎖含量は90%であった。pAGE249の $\alpha$ -1,6-フコースのない糖鎖含量は20%、 $\alpha$ -1,6-フコース結合糖鎖含量は80%であった。以上の結果から、FUT8遺伝子を過剰発現させることにより、産生抗体の $\alpha$ -1,6-フコース結合糖鎖含量が増加することがわかった。

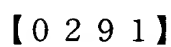
図23は、mfFUT8-6、pAGE249導入株によって産生した抗体から調製したPA化糖鎖を、それぞれ逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。上図にmfFUT8-6、下図にpAGE249の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。緩衝液Aとしてリン酸ナトリウム緩衝液(pH3.8)、緩衝液Bとしてリン酸ナトリウム緩衝液(pH3.8)+0.5%1-ブタノールを用い、以下のグラジエントで分析した。

時間(分)	0	80	90	90.1	120
緩衝液B(%)	0	60	60	0	0

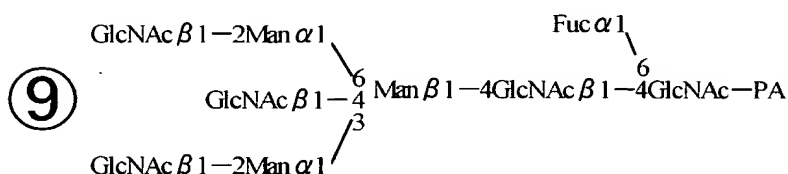
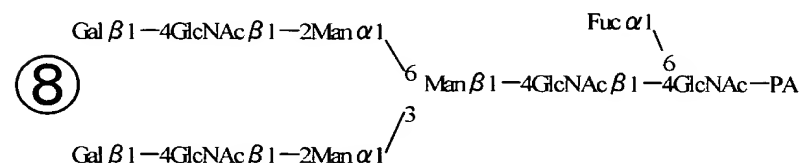
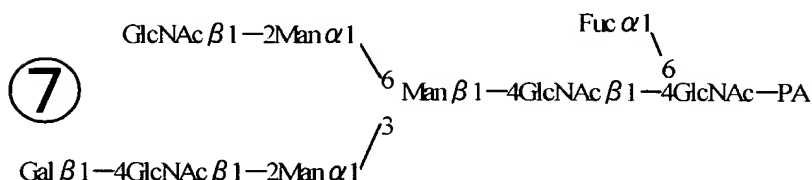
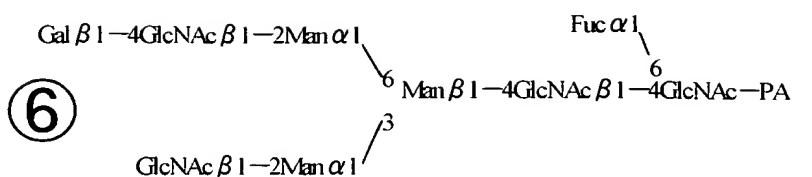
図23と図24で示した①～⑨のピークは、以下の構造を示す。

【0290】

①



## 【化 4】



## 【0292】

GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、Galはガラクトース、Manはマンノース、Fucはフコース、PAはピリジルアミノ基を示す。図23と図24において、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖群の割合は、①～⑨のうち①～④のピークが占める面積、 $\alpha$ -1,6-フコースが結合した糖鎖群の割合は、①～⑨のうち⑤～⑨のピークが占める面積から算出した。

## 【0293】

実施例11. CHO細胞  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子の取得

(1) CHO細胞  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) cDNA配列の取得

実施例8 (1) において培養2日目のCHO/DG44細胞より調製した一本鎖cDNAより、以下の手順でチャイニーズハムスターFUT8 cDNAを取得した(図22)。

まず、マウスFUT8のcDNA配列 [GenBank, AB025198] より、5' 側非翻訳領域に特異的なフォワードプライマー (配列番号 2 1 に示す) および3' 側非翻訳領域に特異的なリバースプライマー (配列番号 2 2 に示す) を設計した。

次にDNAポリメラーゼExTaq (宝酒造社製) を用いて、前述のCHO/DG44細胞由来cDNA 1  $\mu$  lを含む25  $\mu$  lの反応液 [ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/l dNTPs、4 % DMSO、0.5  $\mu$  mol/l 上記特異的プライマー (配列番号 2 1 および配列番号 2 2 ) ] を調製し、PCRを行った。PCRは、94℃で1分間の加熱の後、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして30サイクルの後、さらに72℃で10分間加熱する条件で行った。

#### 【 0 2 9 4 】

PCR後、反応液を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約2Kbを精製した。このDNA断片 4  $\mu$  lを、TOPO TA cloning Kit (Invitrogen社製) の説明書に従ってプラスミドpCR2.1へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌DH5  $\alpha$  株を形質転換した。得られたカナマイシン耐性コロニーのうちcDNAが組み込まれた8 クローンから、公知の方法に従って各々プラスミドDNAを単離した。

各プラスミドに挿入されたcDNAの塩基配列は、DNAシーケンサー377 (Parkin Elmer社製) およびBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer社製) を使用して決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により、全ての挿入cDNAが、CHO細胞FUT8のORF全長を含む配列をコードすることを確認した。このうちPCRに伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミドDNAを選択した。以下、本プラスミドをCHfFUT8-pCR2.1と称す。決定したCHO細胞FUT8 cDNAの塩基配列を配列番号 1 に示した。また、そのアミノ酸配列を配列番号 2 3 に示した。

#### 【 0 2 9 5 】

(2) CHO細胞  $\alpha$ -1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) ゲノム配列の取得

本項 (1) で取得したCHO細胞FUT8 ORF全長cDNA断片をプローブとして用い、CHO-K1細胞由来  $\lambda$ -ファージゲノムライブラリー (STRATEGENE社製) よりモレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、A Laboratory Manual, 2 nd Ed. (1989)等に記載の公知のゲノ



ムスクリーニングの方法に従いCHO細胞FUT8ゲノムクローンを取得した。次に、取得したゲノムクローンを各種制限酵素を用いて消化後、CHO細胞FUT8 cDNAの開始コドンを含むAfaI-Sau3AI断片(約280bp)をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、陽性を示した制限酵素断片のうちXbaI-XbaI断片(約2.5Kb)およびSacI-SacI断片(約6.5Kb)を選択してpBluescriptII KS(+) (Stratagene社製)へ各々挿入した。

#### 【0296】

取得した各ゲノム断片の塩基配列は、DNAシーケンサー377 (Parkin Elmer社製) およびBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer社製)を用いて決定し、方法は添付マニュアルに従った。本法により、XbaI-XbaI断片はCHO細胞FUT8のエクソン2を含む上流イントロン約2.5Kbの配列を、SacI-SacI断片はCHO細胞FUT8のエクソン2を含む下流イントロン約6.5Kbの配列を各々コードすることを確認した。決定したCHO細胞FUT8のエクソン2を含むゲノム領域の塩基配列(約9.0Kb)を配列番号3に示した。

#### 【0297】

##### 実施例12 市販抗体の糖鎖解析

CHO細胞を宿主細胞にして産生させた市販抗HER2/neu抗体Herceptin (GENENTECH社、Roche社製)の糖鎖解析を、実施例10の項(6)の方法にしたがって行った(図24)。ピーク面積から計算すると、Herceptinの $\alpha$ -1,6-フコースのない糖鎖含量は16%、 $\alpha$ -1,6-フコース結合糖鎖含量は84%であった。他の市販抗体に関しても同様の分析を行った結果、Rituxan (GENENTECH社、Roche社、IDEC社製)、Zenapax (Roche社、PDL社製)ではHerceptinよりも $\alpha$ -1,6-フコースのない糖鎖含量が少なかった。

図24は、Herceptinから調製したPA化糖鎖を、逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。逆相HPLCの分析条件、糖鎖構造、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖群の割合の算出は図23と同じ方法で行った。

#### 【0298】

##### 【発明の効果】

本発明によれば、免疫機能分子等の糖タンパク質を生産することが可能な細胞、該細胞を用いた免疫機能分子の製造方法、免疫機能分子、ならびにその用途を提供することができる。

**【0299】****【配列表フリーテキスト】**

配列番号 4—人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号 5—人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号 8—人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号 9—人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号 10—人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号 11—人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号 12—人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号 13—人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号 14—人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号 15—人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号 16—人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号 17—人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号 18—人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号 19—人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号 20—人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号 21—人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列  
配列番号 22—人工配列の説明：人工的に合成したプライマー配列

**【0300】****【配列表】**

## SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> GLYCOPROTEIN PRODUCTION CELL

<130> P-35845

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2008

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 1

aacagaaact tatttttctg tgtggctaac tagaaccaga gtacaatgtt tccaattctt 60

tgagctccga gaagacagaa gggagttgaa actctgaaaa tgcgggcatg gactggttcc 120

tggcgttgga ttatgctcat tctttttgcc tgggggacct tattgtttta tataggtggt 180

catttggttc gagataatga ccaccctgac cattctagca gagaactctc caagattctt 240

gcaaagctgg agcgcttaaa acaacaaaat gaagacttga ggagaatggc tgagtctctc 300

cgaataccag aaggccctat tgatcagggg acagctacag gaagagtccg tgtttttagaa 360

gaacagcttg ttaaggccaa agaacagatt gaaaattaca agaaacaagc taggaatgat 420

ctgggaaagg atcatgaaat ctttaaggagg aggattgaaa atggagctaa agagctctgg 480

ttttttctac aaagtgaatt gaagaaatta aagaaattag aaggaaacga actccaaaga 540

catgcagatg aaattctttt ggatttagga catcatgaaa ggtctatcat gacagatcta 600

tactacctca gtcaaacaga tggagcaggt gagtggcggg aaaaagaagc caaagatctg 660

acagagctgg tccagcggag aataacatat ctgcagaatc ccaaggactg cagcaaagcc 720

agaaagctgg tatgtaatat caacaaaggc tgtggctatg gatgtcaact ccatcatgtg 780

gtttactgct tcatgattgc ttatggcacc cagcgaacac tcatcttgga atctcagaat 840

tggcgctatg ctactggagg atgggagact gtgtttagac ctgtaagtga gacatgcaca 900

gacaggtctg gcctctccac tggacactgg tcaggtgaag tgaaggacaa aaatgttcaa 960

gtggtcgagc tccccattgt agacagcctc catcctcgtc ctccttactt acccttggct 1020

gtaccagaag accttgcaga tcgactcctg agagtccatg gtgatcctgc agtgtgggtg 1080

gtatcccagt ttgtcaaata cttgatccgt ccacaacctt ggctggaaag ggaaatagaa 1140

gaaaccacca agaagcttgg cttcaaacat ccagttattg gagtccatgt cagacgcact 1200

gacaaagtgg gaacagaagc agccttccat ccattgagg aatacatggt acacgttgaa 1260

gaacattttc agcttctcga acgcagaatg aaagtggata aaaaagagt gtatctggcc 1320

actgatgacc cttctttgtt aaaggaggca aagacaaagt actccaatta tgaatttatt 1380

agtgataact ctatttcttg gtcagctgga ctacacaacc gatacacaga aaattcactt 1440

cggggcgtga tcctggatat acactttctc tcccaggctg acttccttgt gtgtactttt 1500

tcatcccagg tctgtagggt tgcttatgaa atcatgcaaa cactgcatcc tgatgcctct 1560

gcaaacttcc attctttaga tgacatctac tattttggag gccaaaatgc ccacaaccag 1620

attgcagttt atcctcacca acctcgaact aaagaggaaa tcccatgga acctggagat 1680

atcattggtg tggctggaaa ccattggaat ggttactcta aagggtgtcaa cagaaaacta 1740

ggaaaaacag gcctgtaccc ttctacaaa gtccgagaga agatagaaac agtcaaatac 1800

cctacatata ctgaagctga aaaatagaga tggagtgtaa gagattaaca acagaattta 1860

gttcagacca tctcagccaa gcagaagacc cagactaaca tatggttcat tgacagacat 1920

gctccgcacc aagagcaagt gggaaccctc agatgctgca ctggtggaac gcctctttgt 1980

gaagggtgc tgtgcctca agcccatg 2008

<210> 2

<211> 1728

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

atgcgggcat ggactggttc ctggcggttg attatgctca ttctttttgc ctgggggacc 60

ttgttat tttt atataggtgg tcatttgggt cgagataatg accaccctga tcaactccagc 120

agagaactct ccaagattct tgcaaagctt gaacgcttaa aacagcaaaa tgaagacttg 180

aggcgaatgg ctgagtctct ccgaatacca gaaggcccca ttgaccaggg gacagctaca 240

ggaagagtcc gtgtttttaga agaacagctt gttaaggcca aagaacagat tgaaaattac 300

aagaaacaag ctagaaatgg tctggggaag gatcatgaaa tcttaagaag gaggattgaa 360

aatggagcta aagagctctg gttttttcta caaagcgaac tgaagaaatt aaagcattta 420

gaaggaaatg aactccaaag acatgcagat gaaattcttt tggatttagg acaccatgaa 480

aggtctatca tgacagatct atactacctc agtcaaacag atggagcagg ggattggcgt 540

gaaaaagagg ccaaagatct gacagagctg gtccagcgga gaataacata tctccagaat 600

cctaaggact gcagcaaagc caggaagctg gtgtgtaaca tcaataaagg ctgtggctat 660

ggttgtcaac tccatcacgt ggtctactgt ttcattgattg cttatggcac ccagcgaaca 720

ctcatcttgg aatctcagaa ttggcgctat gctactgggt gatgggagac tgtgtttaga 780

cctgtaagtg agacatgtac agacagatct ggctctcca ctggacactg gtcaggtgaa 840

gtaaatgaca aaaacattca agtgggtcgag ctccccattg tagacagcct ccacctcgg 900

cctccttact taccactggc tgttccagaa gaccttgcag accgactcct aagagtccat 960

ggtgaccctg cagtgtggtg ggtgtcccag ttgtcaaact attgattcg tccacaacct 1020

tggctggaaa aggaaataga agaagccacc aagaagcttg gcttcaaaca tccagttatt 1080

ggagtccatg tcagacgcac agacaaagtg ggaacagaag cagccttcca ccccatcgag 1140

gagtacatgg tacacgttga agaacatddd cagcttctcg cacgcagaat gcaagtggat 1200

aaaaaaagag tatatctggc tactgatgat cctactttgt taaaggaggc aaagacaaag 1260

tactccaatt atgaattdat tagtgataac tctatdddctt ggtcagctgg actacacaat 1320

cggctacacag aaaattcact tcgggggtgtg atcctggata tacactdddct ctcacaggct 1380

gactdddctag tgtgtactddd ttcateccag gtctgtcggg ttgcttatga aatcatgcaa 1440

accctgcac ctagtcctc tcggaacttc cattctdddgg atgacatcta ctatdddtga 1500

ggccaaaaatg cccacaatca gattgtctgtt tatectcaca aacctcgaac tgaagaggaa 1560

attccaatgg aacctggaga tatcattggg gtggctggaa accattggga tggtdattdct 1620

aaaggatatca acagaaaact tggaaaaaca ggcttatatc cctcctacaa agtccgagag 1680

aagatagaaa cagtcaagta tcccatatat cctgaagctg aaaaatag 1728

<210> 3

<211> 9196

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 3

tctagaccag gctgggtctcg aactcacaga gaaccacctg cctctgccac ctgagtgtg 60

ggattaaagg tgtgcaccac caccgcccgg cgtaaaatca tatttttgaa tattgtgata 120

atttacatta taattgtaag taaaaatitt cagcctatit tgttatacat ttttgcgtaa 180

attattcttt ttgaaagtt ttgttgtcca taatagtcta gggaaacata aagttataat 240

ttttgtctat gtatttgcac atatatctat ttaatctcct aatgtccagg aaataaatag 300

ggtatgtaat agcttcaaca tgtgggtatga tagaattttt cagtgtctata taagttgtta 360

cagcaaagtg ttattaattc atatgtccat atttcaattt tttatgaatt attaaattga 420

atccttaagc tgccagaact agaattttat tttaatcagg aagccccaaa tctgttcatt 480

ctttctatat atgtggaaag gtaggcctca ctaactgatt cttcacctgt tttagaacat 540

ggtccaagaa tggagttatg taaggggaat tacaagtgtg agaaaactcc tagaaaacaa 600

gatgagtctt gtgaccttag ttcttttaaa aacacaaaat tcttggaatg tgttttcatg 660

ttcctcccag gtggatagga gtgagtttat ttcagattat ttattacaac tggctgttgt 720

tacttgtttc tatgtcttta tagaaaaaca tatttttttt gccacatgca gcttgtcctt 780



atgattttat acttgtgtga ctcttaactc tcagagtata aattgtctga tgctatgaat 840  
aaagttggct attgtatgag acttcagccc attcaatta ttggcttcat tctctcagat 900  
cccaccacct ccagagtggg aaacaacttg aaccattaaa cagactttag tctttatttg 960  
aatgatagat ggggatatca gatttatagg cacagggttt tgagaaaggg agaaggtaaa 1020  
cagtagagtt taacaacaac aaaaagtata ctttgtaaac gtaaaactat ttattaaagt 1080  
agtagacaag acattaaata ttccttggga ttagtgcttt ttgaattttg ctttcaaata 1140  
atagtcagtg agtatacccc tccccattc tatattttag cagaaatcag aataaatggg 1200  
gtttctggta cattcttttg tagagaattt attttcttg ggtttttggt catttaaagt 1260  
caataaaaat taaggttcag taatagaaaa aaaactctga tttttggaat cccctttctt 1320  
cagcttttct atttaatctc ttaatgataa ttttaatttg ggccatgtgg tcaaagtata 1380  
tagccttgta tatgtaaagtg ttttaaccaa cctgccttta cagtaactat ataattttat 1440  
tctataatat atgacttttc ttccatagct ttagagttgc ccagtcactt taagttacat 1500  
tttcatatat gttcttttggt ggaggagata attttatttc taagagaatc ctaagcatac 1560  
tgattgagaa atggcaaaca aaacacataa ttaaagctga taaagaacga acatttggag 1620  
tttaaaatac atagccaccc taagggttta actgttggtta gccttctttt ggaattttta 1680

ttagttcata tagaaaaatg gattttatcg tgacatttcc atatatgtat ataatatatt 1740

tacatcatat ccacctgtaa ttattagtgt ttttaaata atttgaaaaa ataatggctt 1800

ggtttgatcc atttgaacct tttgatgttt ggtgtggttg ccaattggtt gatggttatg 1860

ataacctttg cttctctaag gttcaagtca gtttgagaat atgtcctcta aaaatgacag 1920

gttgcaagtt aagtagtgag atgacagcga gatggagtga tgagaatttg tagaaatgaa 1980

ttcacttata ctgagaactt gttttgcttt tagataatga acatattagc ctgaagtaca 2040

tagccgaatt gattaattat tcaaagatat aatcttttaa tccctataaa agaggtatta 2100

cacaacaatt caagaaagat agaattagac ttccagtatt ggagtgaacc atttgttatc 2160

aggtagaacc ctaacgtgtg tggttgactt aaagtgttta ctttttacct gatactgggt 2220

agctaattgt ctttcagcct cctggccaaa gataccatga aagtcaactt acgttgtatt 2280

ctatatctca aacaactcag ggtgtttctt actctttcca cagcatgtag agcccaggaa 2340

gcacaggaca agaaagctgc ctccttgtat caccaggaag atctttttgt aagagtcac 2400

acagtatacc agagagacta attttgtctg aagcatcatg tgttgaaaca acagaaactt 2460

attttcctgt gtggctaact agaaccagag tacaatgttt ccaattcttt gagctccgag 2520

aagacagaag ggagttgaaa ctctgaaaat gcgggcatgg actggttcct ggcgttggat 2580  
tatgctcatt ctttttgcct gggggaccit attgttttat ataggtggtc atttggttcg 2640  
agataatgac caccctgacc attctagcag agaactctcc aagattcttg caaagctgga 2700  
gcgcttaaaa caacaaaatg aagacttgag gagaatggct gagtctctcc ggtaggtttg 2760  
aaatactcaa ggatttgatg aaatactgtg cttgaccttt aggtataggg tctcagtctg 2820  
ctgttgaaaa atataatttc tacaaaccgt ctttgtaaaa ttttaagtat tgtagcagac 2880  
tttttaaaag tcagtgatac atctatatag tcaatatagg ttacatagt tgcaatctta 2940  
ttttgcatat gaatcagtat atagaagcag tggcatttat atgcttatgt tgcatttaca 3000  
attatgttta gacgaacaca aactttatgt gatttggatt agtgctcatt aaatTTTTTT 3060  
attctatgga ctacaacaga gacataaatt ttgaaaggct tagttactct taaattctta 3120  
tgatgaaaag caaaaattca ttgttaaata gaacagtgca tccggaatgt gggtaattat 3180  
tgccatattt ctagtctact aaaaattgtg gcataactgt tcaaagtcac cagttgtttg 3240  
gaaagccaaa gtctgattta aatggaaaac ataaacaatg atatctattt ctagatacct 3300  
ttaacttgca gttactgagt ttacaagttg tctgacaact ttggattctc ttacttcata 3360  
tctaagaatg atcatgtgta cagtgccttac tgtcacttta aaaaactgca gggctagaca 3420

tgcagatatg aagactttga cattagatgt ggtaattggc actaccagca agtgggtatta 3480  
agatacagct gaatatatta ctttttgagg aacataattc atgaatggaa agtggagcat 3540  
tagagaggat gccttctggc tctcccacac cactgtttgc atccattgca tttcacactg 3600  
cttttagaac tcagatgttt catatggat attgtgtaac tcaccatcag ttttatcttt 3660  
aatgtctat ggatgataat gttgtatgtt aacactttta caaaaacaaa tgaagccata 3720  
tcctcgggtg gagttgtgat ggtggtaatt gtcacaatag gattattcag caaggaacta 3780  
agtcagggac aagaagtggg cgatactttg ttggattaaa tcattttact ggaagttcat 3840  
cagggagggt tatgaaagtt gtggtctttg aactgaaatt atatgtgatt cattattctt 3900  
gatttaggcc ttgctaatag taactatcat ttattgggaa tttgtcatat gtgccaattt 3960  
gtcatgggcc agacagcgtg ttttactgaa tttctagata tctttatgag attctagtag 4020  
tgttttcagc cattttacag atgaagaatc ttaaaaaatg ttaaataatt tagtttgccc 4080  
aagattatac gttaacaaat ggtagaacct tctttgaatt ctggcagtat ggctacacag 4140  
tccgaactct tatcttccta agctgaaaac agaaaaagca atgaccaga aaattttatt 4200  
taaaagtctc aggagagact tcccatcctg agaagatctc tttcccttt tataatttag 4260

gctcctgaat aatcactgaa ttttctccat gtccatcta tagtactgtt atttctgttt 4320  
tccttttttc ttaccacaaa gtatcttggt ttgctgtat gaaagaaaat gtgttattgt 4380  
aatgtgaaat tctctgtccc tgcagggtcc cacatccgcc tcaatcccaa ataaacacac 4440  
agaggctgta ttaattatga aactgttggt cagttggcta gggcttctta ttggctagct 4500  
ctgtcttaat tattaaacca taactactat tgtaagtatt tccatgtggt cttatcttac 4560  
caaggaaagg gtccaggac ctcttactcc tctggcgtgt tggcagtga gagagagag 4620  
cgatttccta ttgtctctg cttatcttct gattctgctc agctatgtca ctctctgcct 4680  
ggccaatcag ccaatcagtg ttttatcat tagccaataa aagaacatt tacacagaag 4740  
gacttcccc atcatgttat ttgtatgagt tcttcagaaa atcatagtat cttttaatac 4800  
taatttttat aaaaaattaa ttgtattgaa aattatgtgt atatgtgtct gtgtgtcgat 4860  
ttgtgctcat aagtagcatg gagtgcagaa gagggaatca gatctttttt taagggacaa 4920  
agagtttatt cagattacat ttttaaggtga taatgtatga ttgcaagggt atcaacatgg 4980  
cagaaatgtg aagaagctgg tcacattaca tccagagtca agagtagaga gcaatgaatt 5040  
gatgcatgca ttctgtgct cagctcactt ttctggagc tgagctgatt gtaagccatc 5100  
tgatgtcttt gctgggaact aactcaaagg caagttcaaa acctgttctt aagtataagc 5160

catctctcca gtccttcata tggctcttta agacactttc tttatattct tgtacataga 5220

aattgaattc ctaacaactg cattcaaatt acaaaatagt ttttaaaagc tgatataata 5280

aatgtaaata caatctagaa cattttttata aataagcata ttaactcagt aaaaataaat 5340

gcatggttat tttccttcat tagggaagta tgtctcccca ggctgttctc tagattctac 5400

tagtaatgct gtttgtacac catccacagg ggttttatth taaagctaag acatgaatga 5460

tggacatgct tgtttagcatt tagacttttt tccttactat aattgagcta gtatthttgt 5520

gctcagtttg atatctgtta attcagataa atgtaatagt aggtaatttc tttgtgataa 5580

aggcatataa attgaagttg gaaaacaaaa gcctgaaatg acagthttta agattcagaa 5640

caataattht caaaagcagt tacccaactt tccaaatata atctgcagtt ttcttgatat 5700

gtgataaatt tagacaaaga aatagcacat tttaaaatag ctatttactc ttgattthtt 5760

tttcaaattt aggctagttc actagttgtg tgtaaggtta tggctgcaaa catctttgac 5820

ttctggtttag ggaatccagg atgattttacg tgtttggcca aaatcttggt ccattctggg 5880

tttcttctct atctaggttag ctagcacaag ttaaagggtg ggtagtattg gaaggctctc 5940

aggatatatat ttctatatthc tgtatthttt tcctctgtca tatatthgct ttctgtthta 6000

ttgatttcta ctgttagttt gatacttact ttcttacact ttctttggga tttattttgc 6060

tgttctaaga tttcttagca agttcatatc actgatttta acagttgctt cttttgtaat 6120

atagactgaa tgcccccttat ttgaaatgct tgggatcaga aactcagatt tgaacttttc 6180

ttttttaata tttccatcaa gtttaccagc tgaatgtcct gatccaagaa tatgaaatct 6240

gaaatgcttt gaaatctgaa acttttagag tgataaagct tccctttaaa ttaattttgtg 6300

ttctatattt ttgacaatg tcaacctttc attgttatcc aatgagtga catattttca 6360

atttttttgt ttgatctgtt atattttgat ctgaccatat ttataaaatt ttattttaatt 6420

tgaatgttgt gctgttactt atctttatta ttattttgc ttattttcta gccaaatgaa 6480

attatattct gtattatttt agtttgaatt ttactttgtg gcttagtaac tgccttttgt 6540

tggtgaatgc ttaagaaaaa cgtgtggctt actgatattg gttctaattt tatatagcat 6600

gttgtttgtt aggtagttag ttatgctggt cagattgtct tgagtttatg caaatgtaaa 6660

atatttagat gcttgttttg ttgtctaaga acaaagtatg cttgctgtct cctatcggtt 6720

ctggtttttc cattcatctc ttcaagctgt tttgtgtgtt gaatactaac tccgtactat 6780

cttgttttct gtgaattaac cccctttcaa aggtttcttt tctttttttt ttttaaggac 6840

aacaagttta ttcagattac attttaagct gataatgtat gattgcaagg ttatcaacat 6900

ggcagaaatg tgaagaagct aggcacatta catccacatg gagtcaagag cagagagcag 6960

tgaattaatg catgcattcc tgtggtcagc tcacttttcc tattcttaga tagtctagga 7020

tcataaacct ggggaatagt gctaccacaa tgggcatatc cacttacttc agttcatgca 7080

atcaaccaag gcacatccac aggaaaaact gatttagaca acctctcatt gagactcttc 7140

ccagatgatt agactgtgtc aagttgacaa ttaaaactat cacacctgaa gccatcacta 7200

gtaaatataa tgaaaatgtt gattatcacc ataattcatc tgtatccctt tgttattgta 7260

gattttgtga agttcctatt caagtccttg ttccttcctt aaaaacctgt tttttagtta 7320

aataggtttt ttagtgttcc tgtctgtaaa tactttttta aagttagata ttattttcaa 7380

gtatgttctc ccagtccttg gcttgatatt tcatcccttc aatacatata tttttgtaat 7440

ttattttttt tatttaaatt agaaacaaag ctgcttttac atgtcagtct cagttccctc 7500

tcctccctt cctccctgc tccccaccta agccccaatt ccaactcctt tcttctcccc 7560

aggaagggtg aggccctcca tgggggaaat cttcaatgtc tgtcatatca tttggagcag 7620

ggcctagacc ctccccagtg tgtctaggct gagagagtat ccctctatgt ggagagggct 7680

cccaaagttc atttgtgtac taggggtaaa tactgatcca ctatcagtgg ccccatagat 7740



tgtccggacc tccaaactga ctctctcctt cagggagtct ggaacagttc tatgctggtt 7800

tcccagatat cagtctgggg tccatgagca accccttggt caggtcagtt gtttctgtag 7860

gtttccccag cccggtcttg acccctttgc tcatcacttc tccctctctg caactggatt 7920

ccagagttca gctcagtgtt tagctgtggg tgtctgcac tgcctccatc agctactgga 7980

tgagggtctt aggatggcat ataaggtagt catcagttc attatcagag aagggtttt 8040

aaggtagcct ctgattatt gcttagattg ttagttgggg tcaaccttgt aggtctctgg 8100

acagtacag aattctcttt aaacctataa tggctccctc tgtggtggta tcccttttct 8160

tgtctcatc cgttctctcc ctgactagat ctctctgct cctcatgtcc tectctcccc 8220

tcccttctc cctttctctt tcttctaact ccctctcccc tccacccacg atccccatta 8280

gcttatgaga tcttgctcct attttagcaa aaccttttg gctataaaat taattaattt 8340

aatatgctta taccaggttt attttggtc gtatttgtat gtgtttggtt agtgttttta 8400

accttaattg acatgtatcc ttatatctag acacagattt aaatatttga agtttttttt 8460

tttttttttt ttaaagattt atttattttt tatgtcttct gcctgcatgc cagaagaggg 8520

caccagatct cattcaaggt ggttgtgagc caccatgtgg ttgctgggaa ttgaactcag 8580

gacctctgga agaacagtca gtgctcttaa ccgctgagcc atctctccag cccctgaagt 8640

gtttctttta aagaggatag cagtgcata ttttccctt tgaccaatga ctcctacctt 8700

actgaattgt tttagccatt tatatgtaat gctgttacca ggtttacatt ttcttttatc 8760

ttgctaaatt tcttccctgt ttgtctcatc tcttattttt gtctgttgga ttatataggc 8820

ttttattttt ctgtttttac agtaagttat atcaaattaa aattatttta tggaatgggt 8880

gtgttgacta catgtatgtc tgtgcaccat gtgctgacct ggtcttggcc agaagaaggt 8940

gtcatattct ctgaaactgg tattgtggat gttacgaact gccatagggt gctaggaatc 9000

aaaccccagc tcctctggaa aagcagccac tgctctgagc cactgagtc tctcttcaag 9060

caggtgatgc caacttttaa tggttaccag tggataagag tgcttgatc tctagcacc 9120

atgaaaattt atgcattgct atatgggctt gtcacttcag cattgtgtga cagagacagg 9180

aggatcccaa gagctc 9196

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

end.

<400> 4

actcatcttg gaatctcaga attgg 25

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

end.

<400> 5

cttgaccgtt tctatcttct ctcg

24

<210> 6

<211> 979

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 6

actcatcttg gaatctcaga attggcgcta tgctactgga ggatgggaga ctgtgttttag 60

acctgtaagt gagacatgca cagacaggtc tggcctctcc actggacact ggtcagggtga 120

agtgaaggac aaaaatgttc aagtggtcga gctccccatt gtagacagcc tccatcctcg 180

tcctccttac ttacccttgg ctgtaccaga agaccttgca gatcgactcc tgagagtcca 240

tggtgatcct gcagtgtggt gggatatccca gtttgtcaaa tacttgatcc gtccacaacc 300

ttggctggaa agggaaatag aagaaaccac caagaagctt ggcttcaaac atccagttat 360

tggagtccat gtcagacgca ctgacaaagt gggaacagaa gcagccttcc atcccattga 420

ggaatacatg gtacacgttg aagaacattt tcagcttctc gaacgcagaa tgaaagtgga 480

taaaaaaga gtgtatctgg ccactgatga ccttctttg ttaaaggagg caaagacaaa 540

gtactccaat tatgaattta ttagtgataa ctctatttct tggtcagctg gactacacaa 600

ccgatacaca gaaaattcac ttcggggcgt gatcctggat atacactttc tctcccaggc 660

tgacttcctt gtgtgtactt ttcatccca ggtctgtagg gttgcttatg aaatcatgca 720

aacactgcat cctgatgcct ctgcaaactt ccattcttta gatgacatct actatitttg 780

aggccaaaat gcccacaacc agattgcagt ttatcctcac caacctcgaa ctaaagagga 840

aatcccatg gaacctggag atatcattgg tgtggctgga aaccattgga atggttactc 900

taaaggtgtc aacagaaaac taggaaaaac aggctgtac ccttcctaca aagtccgaga 960

gaagatagaa acggtcaag 979

<210> 7

<211> 979

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 7

actcatcttg gaatctcaga attggcgcta tgctactggg ggatgggaga ctgtgtttag 60

acctgtaagt gagacatgca cagacagatc tggcctctcc actggacact ggtcagggtga 120

agtgaatgac aaaaatattc aagtgggtgga gctccccatt gtagacagcc ttcacacctg 180  
gcctccttac ttaccactgg ctgttccaga agaccttgca gatcgactcg taagagtcca 240  
tggtgatcct gcagtgtggt ggggtgtccca gttcgtcaaa tatttgattc gtccacaacc 300  
ttggctagaa aaggaaatag aagaagccac caagaagctt ggcttcaaac atccagtcac 360  
tggagtccat gtcagacgca cagacaaagt gggaacagag gcagccttcc atcccatcga 420  
agagtacatg gtacatgttg aagaacattt tcagcttctc gcacgcagaa tgcaagtgga 480  
taaaaaaaga gtatatctgg ctaccgatga ccctgctttg ttaaaggagg caaagacaaa 540  
gtactccaat tatgaattta ttagtgataa ctctatttct tggtcagctg gactacacaa 600  
tcggtacaca gaaaattcac ttcggggcgt gatcctggat atacacttcc tctctcaggc 660  
tgacttccta gtgtgtactt tttcatccca ggtctgtcgg gttgcttatg aaatcatgca 720  
aacctgcat cctgatgcct ctgcaaactt ccactcttta gatgacatct actatttttg 780  
aggccaaaat gccacacaacc agattgccgt ttatcctcac aaacctcgaa ctgatgagga 840  
aattccaatg gaacctggag atatcattgg tgtggctgga aaccattggg atggttattc 900  
taaagggtgtc aacagaaaac ttggaaaaac aggcttatat cctcctaca aagtccgaga 960  
gaagatagaa acggtcaag 979

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

end.

<400> 8

aagtataagc ttacatggat gacgatatcg ctgcgctcgt

40

<210> 9

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

end.

<400> 9

atttaactgc aggaagcatt tgcggtggac gatggagggg

40

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

end.

<400> 10

atttaaggta ccgaagcatt tgcggtgcac gatggagggg

40

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

end.

<400> 11

ctccaattat gaatttatta gtg

23

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

end.

<400> 12

ggatgtttga agccaagctt cttgg

25

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

end.

<400> 13

gtccatggtg atcctgcagt gtgg

24

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA  
end.

<400> 14

caccaatgat atctccaggt tcc

23

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA  
end.

<400> 15

gatatcgctg cgctcgttgt cgac

24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA  
end.

<400> 16

caggaaggaa ggctggaaaa gagc

24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA



end.

<400> 17

gatatcgctg cgctcgctgt cgac

24

<210> 18

<1> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

end.

<400> 18

caggaaggaa ggctggaaga gagc

24

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

end.

<400> 19

atgcgggcat ggactggttc ctgg

24

<210> 20

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

end.

<400> 20

ctatattttca gcttcaggat atgtggg

27

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA

end.

&lt;400&gt; 21

gtctgaagca ttatgtgttg aagc

24

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA

end.

&lt;400&gt; 22

gtgagtacat tcattgtact gtg

23

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 575

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Cricetulus griseus

&lt;400&gt; 23

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe

1

5

10

15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp

20

25

30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala

35

40

45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala

50

55

60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr

65

70

75

80

Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln

85

90

95

Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Asp Leu Gly Lys Asp His

100

105

110

Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe

115

120

125

Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Lys Leu Glu Gly Asn Glu

130

135

140

Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu

145

150

155

160

Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala

165	170	175
Gly Glu Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln		
180	185	190
Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg		
195	200	205
Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu		
210	215	220
His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr		
225	230	235
240		
Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu		
245	250	255
Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu		
260	265	270
Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val		
275	280	285
Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu		
290	295	300
Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His		
305	310	315
320		

Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile  
325 330 335

Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Arg Glu Ile Glu Glu Thr Thr Lys Lys  
340 345 350

Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp  
355 360 365

Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val  
370 375 380

His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Glu Arg Arg Met Lys Val Asp  
385 390 395 400

Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu  
405 410 415

Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile  
420 425 430

Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg  
435 440 445

Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val  
450 455 460

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln  
465 470 475 480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile  
485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro  
500 505 510

His Gln Pro Arg Thr Lys Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile  
515 520 525

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asn Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn  
530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu  
545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys  
565 570 575

<210> 24

<211> 575

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe  
1 5 10 15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp  
20 25 30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala  
35 40 45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala  
50 55 60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr  
65 70 75 80

Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln  
85 90 95

Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Gly Leu Gly Lys Asp His  
100 105 110

Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe  
115 120 125

Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys His Leu Glu Gly Asn Glu  
130 135 140

Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu  
145 150 155 160

Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala  
165 170 175

Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln  
180 185 190

Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg  
195 200 205

Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu  
210 215 220

His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr  
225 230 235 240

Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu  
245 250 255

Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu  
260 265 270

Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Asn Asp Lys Asn Ile Gln Val  
275 280 285

Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu  
290 295 300

Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His  
305 310 315 320

Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile



325	330	335	
Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys			
340	345	350	
Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp			
355	360	365	
Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val			
370	375	380	
His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp			
385	390	395	400
Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Thr Leu Leu Lys Glu			
405	410	415	
Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile			
420	425	430	
Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg			
435	440	445	
Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val			
450	455	460	
Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln			
465	470	475	480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile  
 485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro  
 500 505 510

His Lys Pro Arg Thr Glu Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile  
 515 520 525

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Ile Asn  
 530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu  
 545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys  
 565 570 575

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【図 1】

図 1 は、精製した5種類の抗GD3キメラ抗体のSDS-PAGE（4～15%グラジエントゲルを使用）の電気泳動パターンを示した図である。上図が非還元条件、下図が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン1が高分子量マーカー、2がYB2/0-GD3キメラ抗体、3がCHO/DG44-GD3キメラ抗体、4がSP2/0-GD3キメラ抗体、5がNS0-GD3キメラ抗体(302)、6がNS0-GD3キメラ抗体(GIT)、7が低分子量マーカーの泳動パターンをそれぞれ示す。

## 【図 2】

図 2 は、精製した5種類の抗GD3キメラ抗体のGD3との結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸はGD3との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。○がYB2/0-GD3キメラ抗体、●がCHO/DG44-GD3キメラ抗体、□がSP2/0-GD3キメラ抗体、■がNS0-GD3キメラ抗体(302)、△がNS0-GD3キメラ抗体(GIT)の活性をそれぞれ示す。

## 【図 3】

図 3 は、精製した5種類の抗GD3キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株G-361に対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○がYB2/0-GD3キメラ抗体、●がCHO/DG44-GD3キメラ抗体、□がSP2/0-GD3キメラ抗体、■がNS0-GD3キメラ抗体(302)、△がNS0-GD3キメラ抗体(GIT)の活性をそれぞれ示す。

## 【図 4】

図 4 は、精製した3種類の抗hIL-5R  $\alpha$  CDR移植抗体のSDS-PAGE (4~15%グラジエントゲルを使用)の電気泳動パターンを示した図である。上図が非還元条件、下図が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン1が高分子量マーカー、2がYB2/0-hIL-5RCR抗体、3がCHO/d-hIL-5RCR抗体、4がNS0-hIL-5RCR抗体、5が低分子量マーカーの泳動パターンをそれぞれ示す。

## 【図 5】

図 5 は、精製した3種類の抗hIL-5R  $\alpha$  CDR移植抗体のhIL-5R  $\alpha$  との結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸はhIL-5R  $\alpha$  との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。○がYB2/0-hIL-5RCR抗体、●がCHO/d-hIL-5RCR抗体、□がNS0-hIL-5RCR抗体の活性をそれぞれ示す。

## 【図 6】

図 6 は、精製した3種類の抗hIL-5R  $\alpha$  CDR移植抗体のhIL-5R発現マウスT細胞株C TLL-2(h5R)に対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○がYB2/0-hIL-5RCR抗体、●がCHO/d-hIL-5RCR抗体、□がNS0-hIL-5RCR抗体の活性をそれぞれ示す。

## 【図 7】

図7は、精製した3種類の抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体のカニクイザルのhIL-5誘発好酸球増加モデルに対する抑制作用を示した図である。縦軸に末梢血中好酸球数、横軸に日数（抗体及びhIL-5の投与開始日を0日とした）をそれぞれ示す。101、102が抗体非投与群、301、302、303がYB2/0-hIL-5RCDR抗体投与群、401、402、403がCHO/d-hIL-5RCDR抗体投与群、501、502、503がNS0-hIL-5RCDR抗体投与群の結果をそれぞれ示す。

#### 【図8】

図8は、YB2/0が生産した精製抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体（上側）およびNS0が生産した精製抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体（下側）のPA化糖鎖の逆相HPLC溶離の溶離図（左図）とそのPA化糖鎖を $\alpha$ -L-フコシダーゼ処理した後に逆相HPLCで分析して得た溶離図（右図）を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

#### 【図9】

図9は、CHO/d細胞が生産した精製抗hIL-5R $\alpha$  CDR移植抗体からPA化糖鎖を調製し、逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

#### 【図10】

図10は、非吸着画分、吸着画分の一部のGD3との結合活性を、抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸はGD3との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。●が非吸着画分、○が吸着画分の一部をそれぞれ示す。下図は非吸着画分、吸着画分の一部のヒトメラノーマ細胞株G-361に対するADCC活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。●が非吸着画分、○が吸着画分の一部をそれぞれ示す。

#### 【図11】

図11は、非吸着画分、吸着画分の一部から調製したPA化糖鎖を逆相HPLCで分析して得た溶離図を示したものである。左図に非吸着画分の溶離図、右図に吸着画分の一部の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

#### 【図12】

図 1 2 は、プラスミド CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 の構築を示した図である。

【図 1 3】

図 1 3 は、プラスミド CHAc-pBS および YBAc-pBS の構築を示した図である。

【図 1 4】

図 1 4 は、プラスミド CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 の構築を示した図である。

【図 1 5】

図 1 5 は、プラスミド CHAc-d-pBS および YBAc-d-pBS の構築を示した図である。

【図 1 6】

図 5 競合的 RT-PCR 法を用いた各宿主細胞株における FUT8 転写産物量の定量結果を示した図である。ラット FUT8 配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合の各宿主細胞株における FUT8 転写産物の量を示す。■が CHO 細胞株、□が YB2/O 細胞株を宿主細胞として用いた場合をそれぞれ示す。

【図 1 7】

図 1 7 は、プラスミド mfFUT8-pCR2.1 の構築を示した図である。

【図 1 8】

図 1 8 は、プラスミド pBSmfFUT8 の構築を示した図である。

【図 1 9】

図 1 9 は、プラスミド pAGEmfFUT8 の構築を示した図である。

【図 2 0】

図 2 0 は、競合的 RT-PCR 法を用いた FUT8 遺伝子過剰発現株の該遺伝子発現量解析結果を示した図である。縦軸に  $\beta$ -actin 転写量に対する FUT8 転写量の相対値を示した。

【図 2 1】

図 2 1 は、FUT8 遺伝子過剰発現株より精製した抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株 G-361 に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞傷害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示した。

【図 2 2】

図 22 は、プラスミド CHfFUT8-pCR2.1 の構築を示した図である。

【図 23】

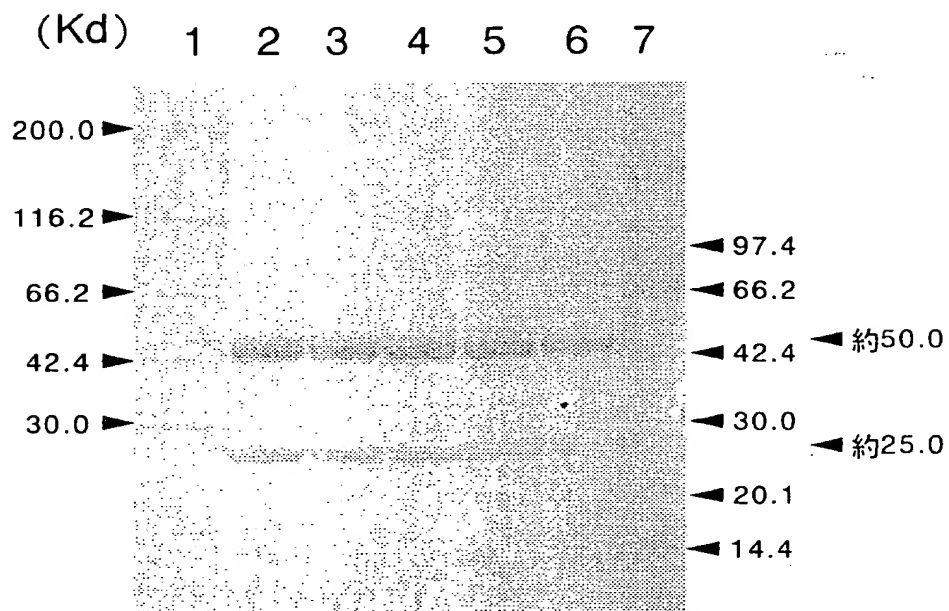
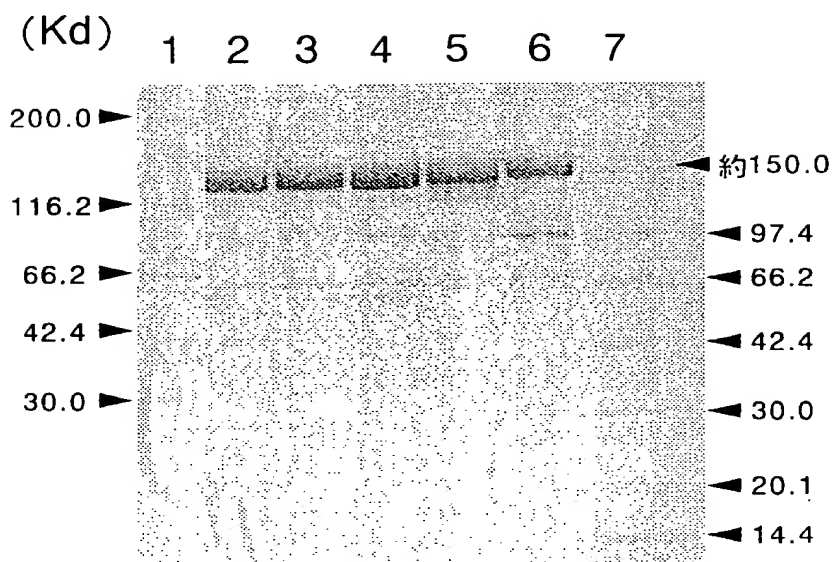
mfFUT8-6、pAGE249 導入株によって産生した抗体から調製した PA 化糖鎖を、それぞれ逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。上図に mfFUT8-6、下図に pAGE249 の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

【図 24】

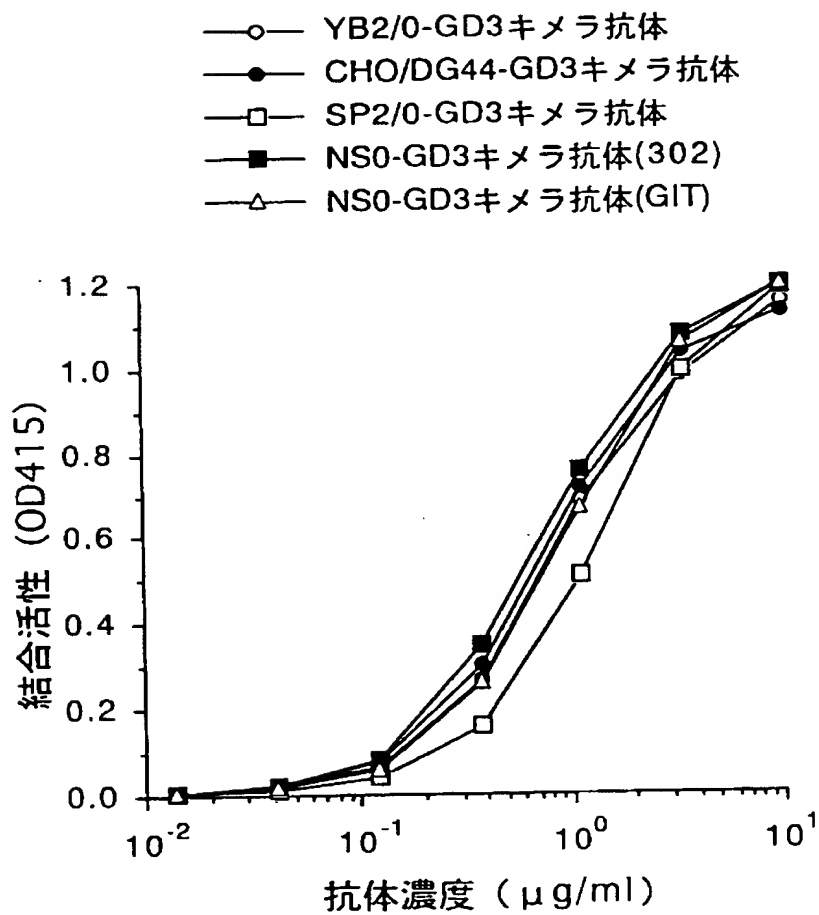
Herceptin から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。逆相 HPLC の分析条件、糖鎖構造、 $\alpha$ -1,6-フコースを持たない糖鎖群の割合の算出は図 23 と同じ方法で行った。

【書類名】 図面

【図 1】

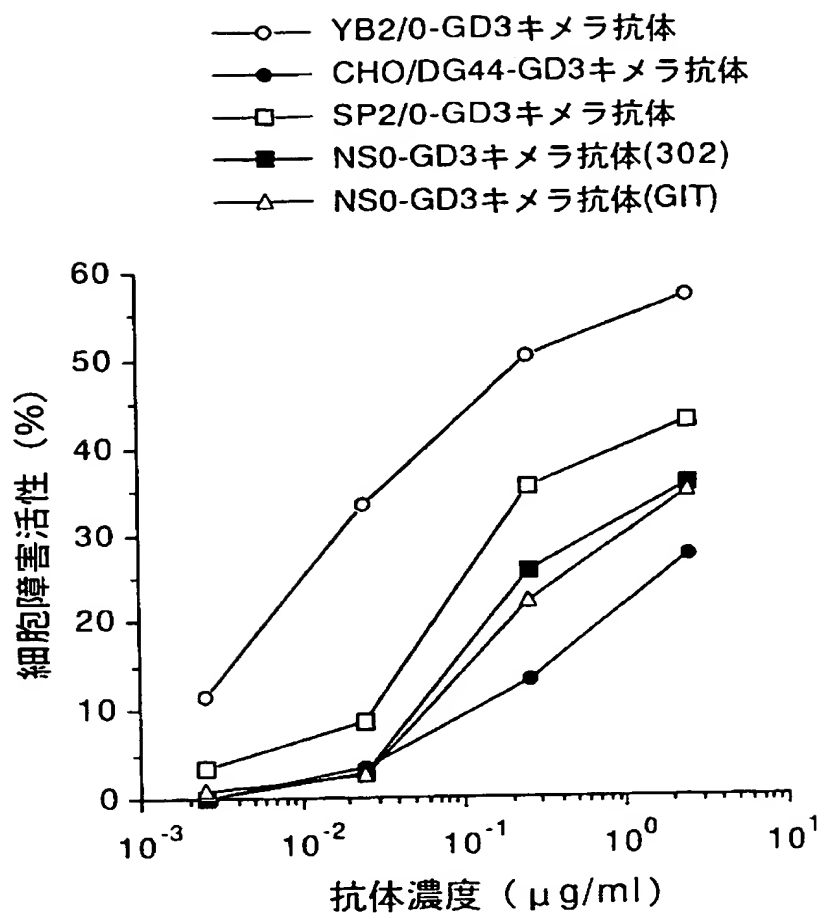


【図 2】

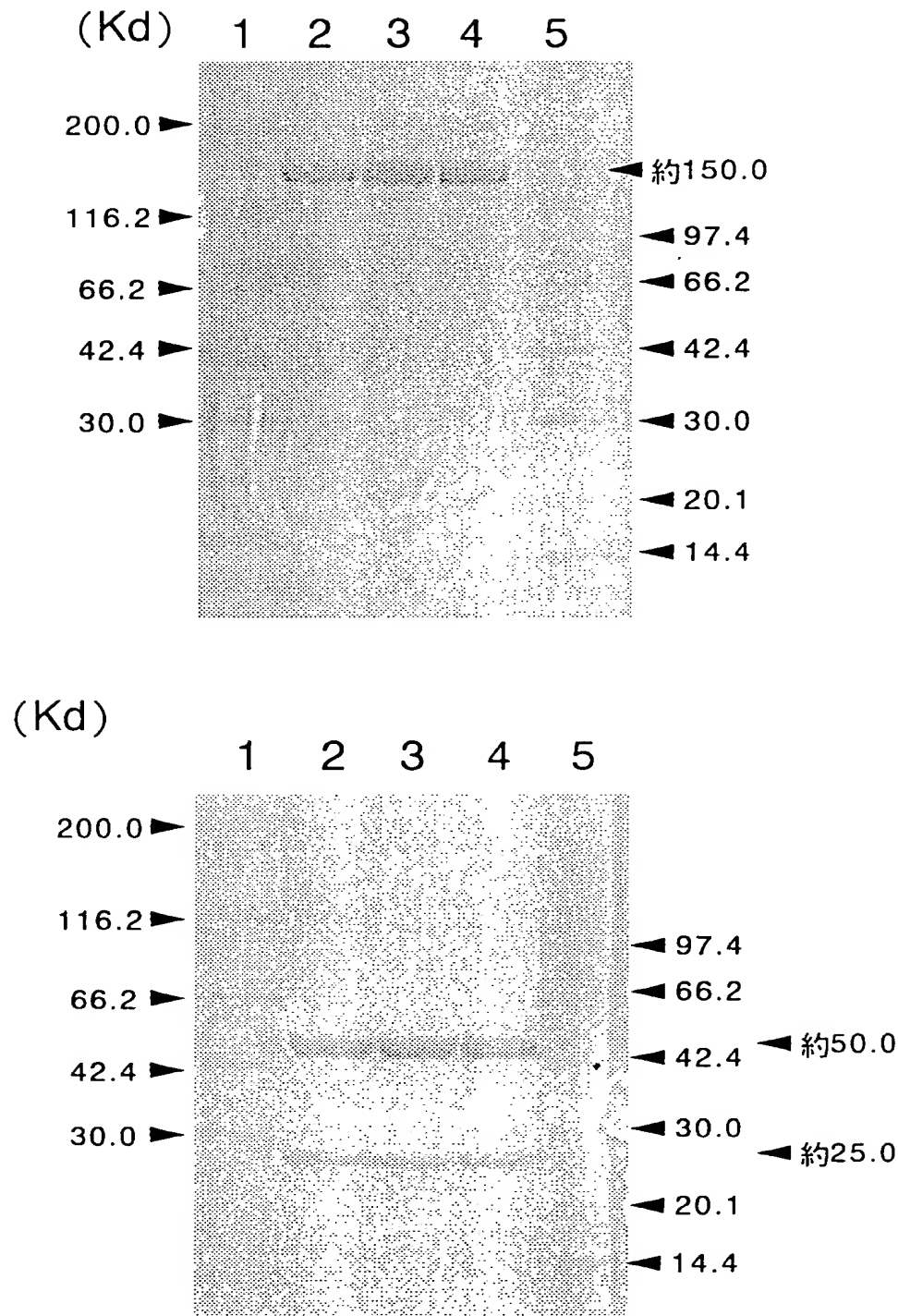




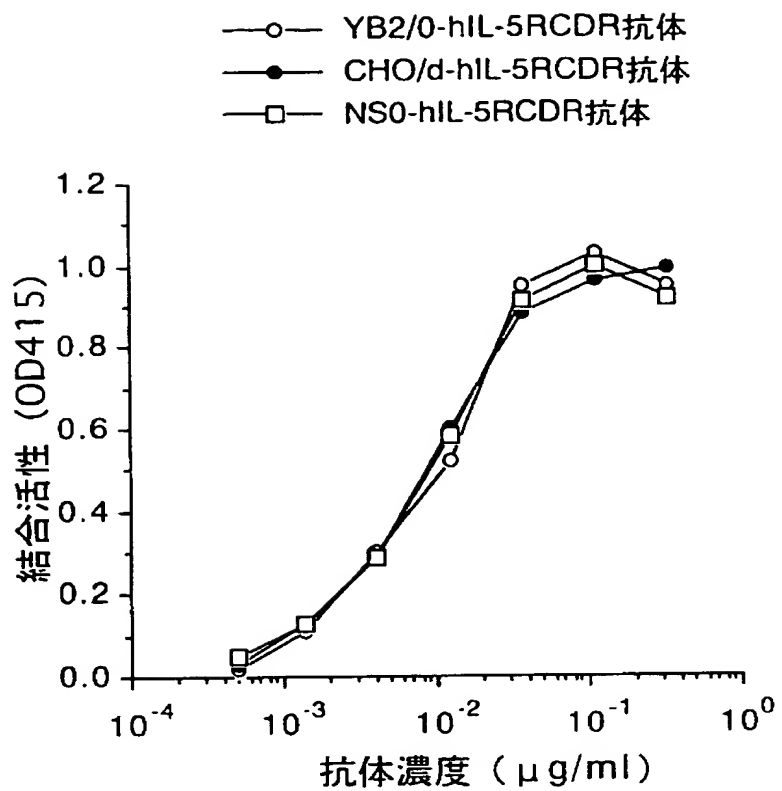
【図 3】



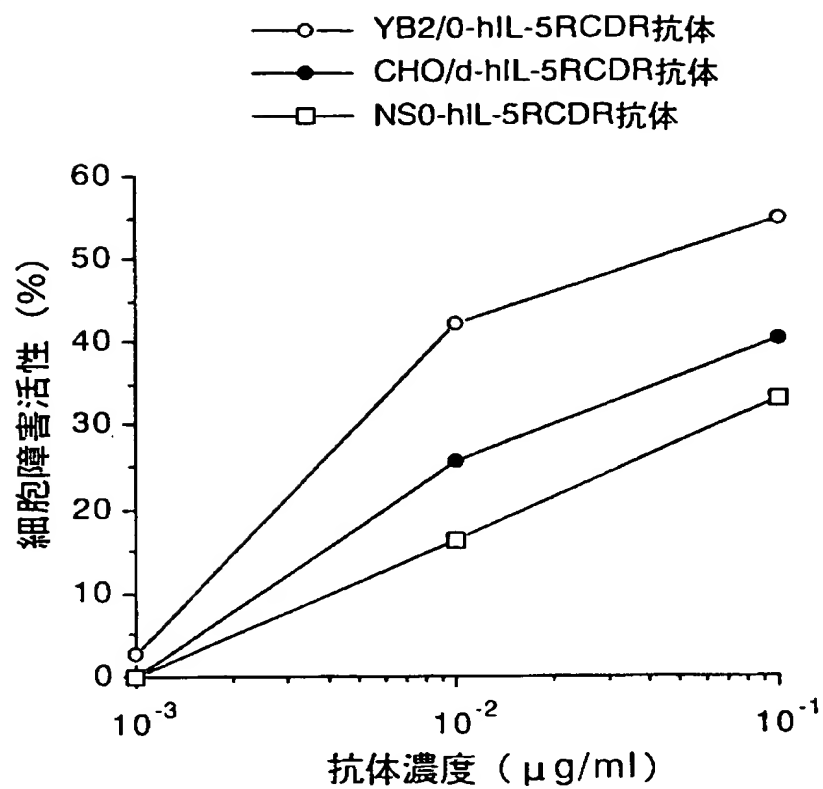
【図 4】



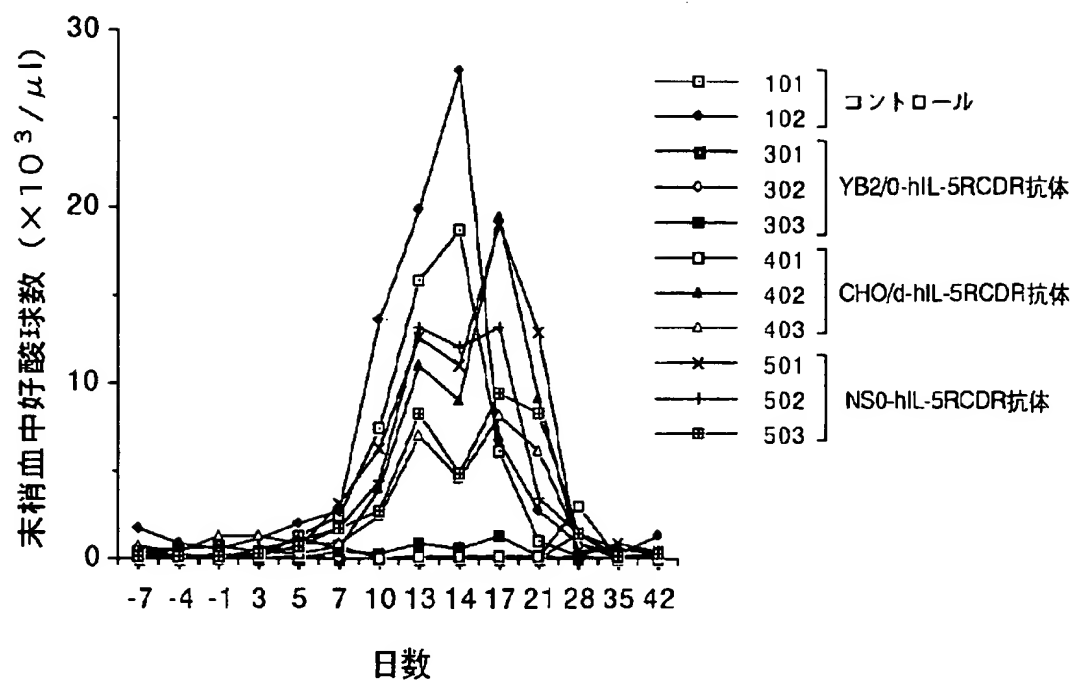
【図 5】



【図 6】

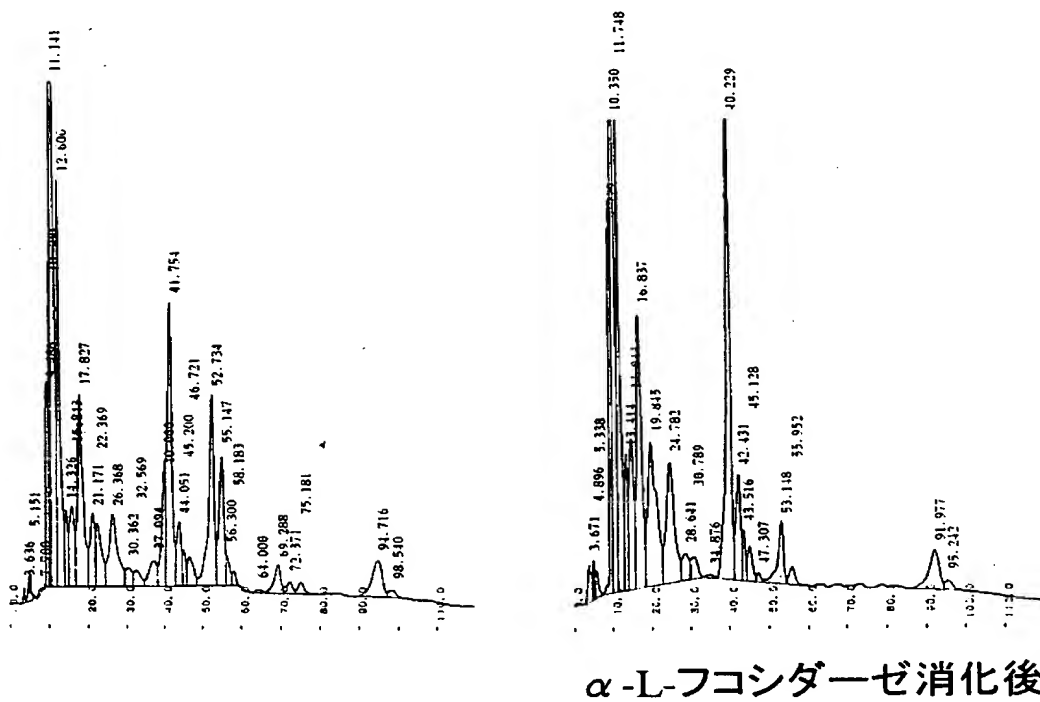


【図 7】

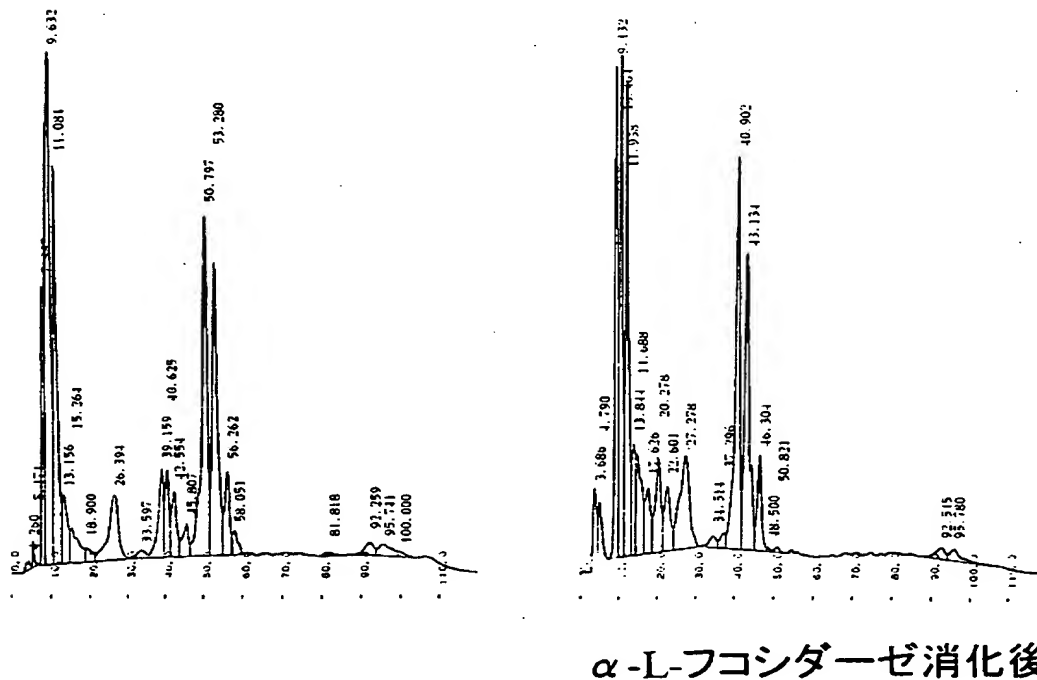


【図 8】

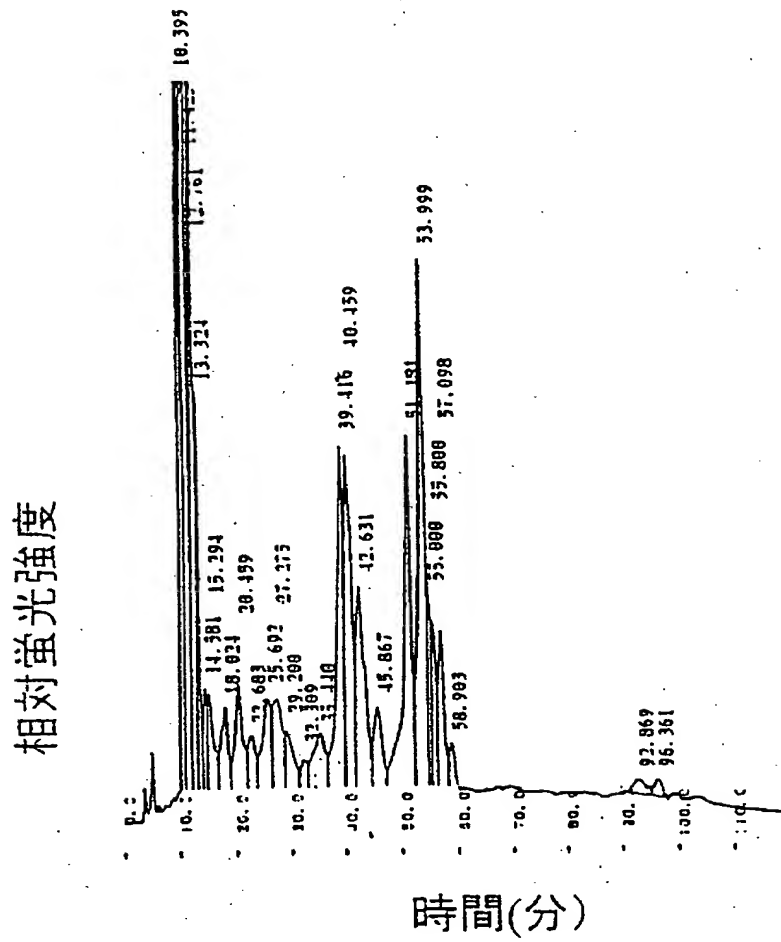
## YB2/O-hIL-5RCDR 抗体



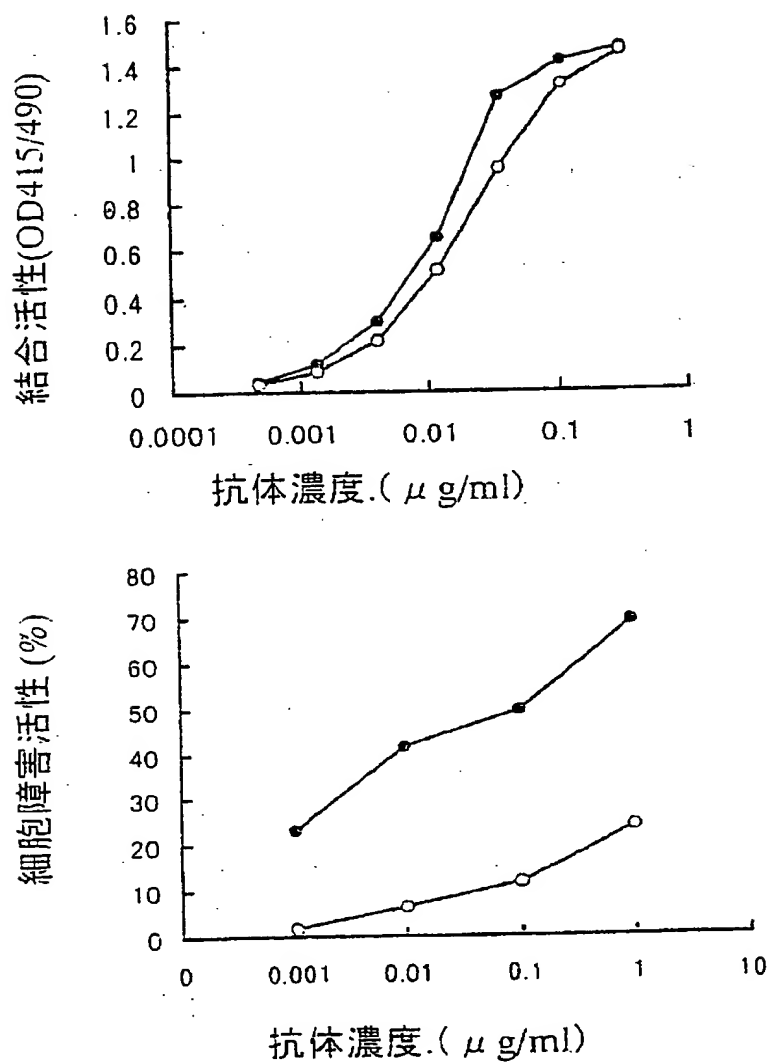
## NS0-hIL-5RCDR 抗体



【図 9】

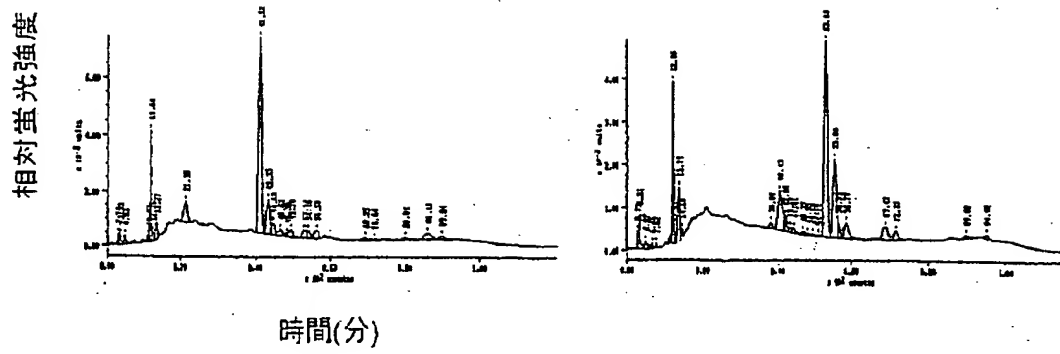


【図 10】

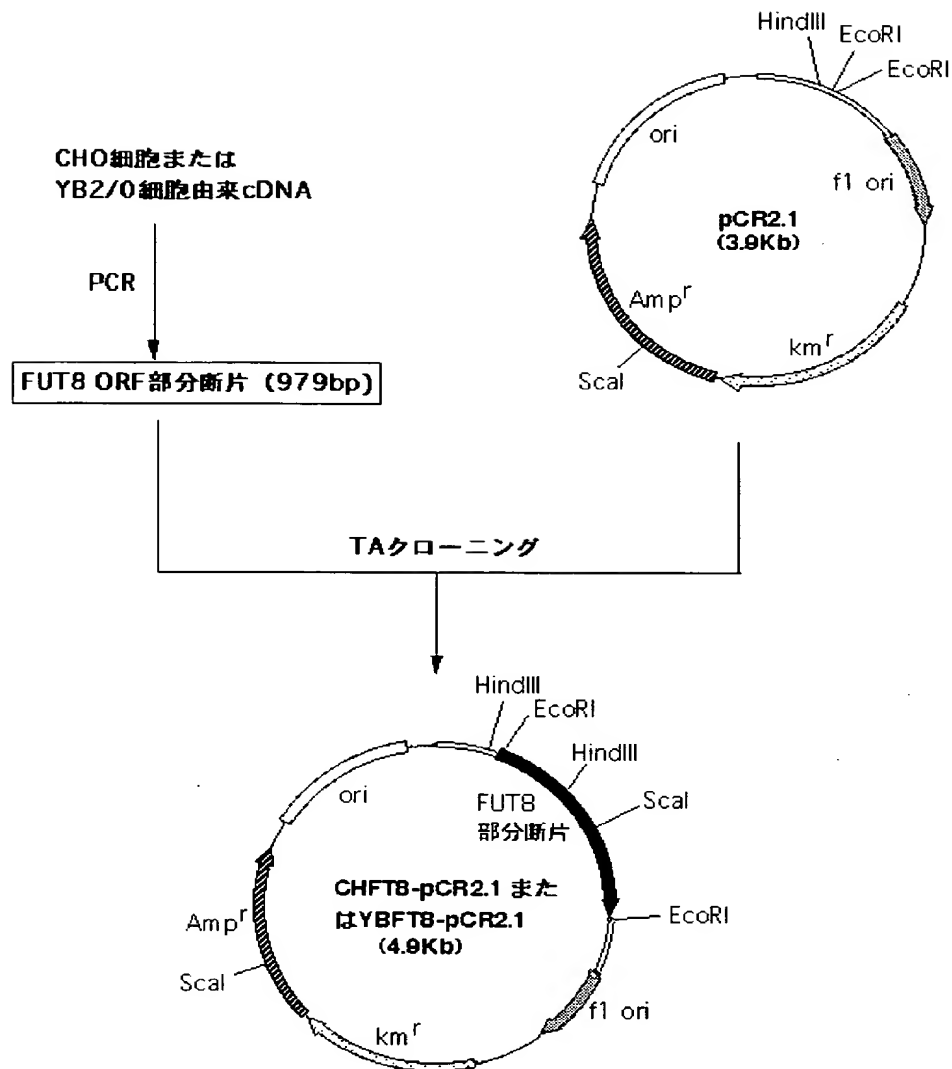




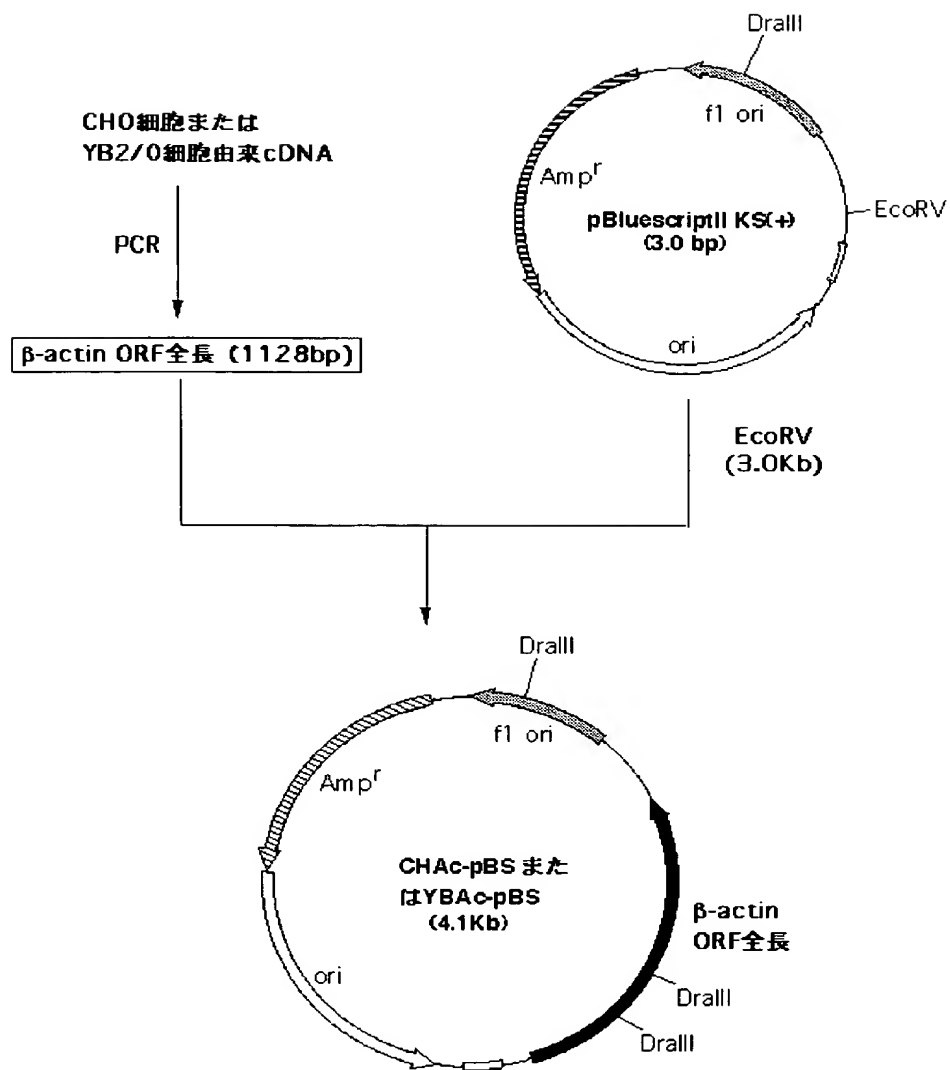
【図 11】



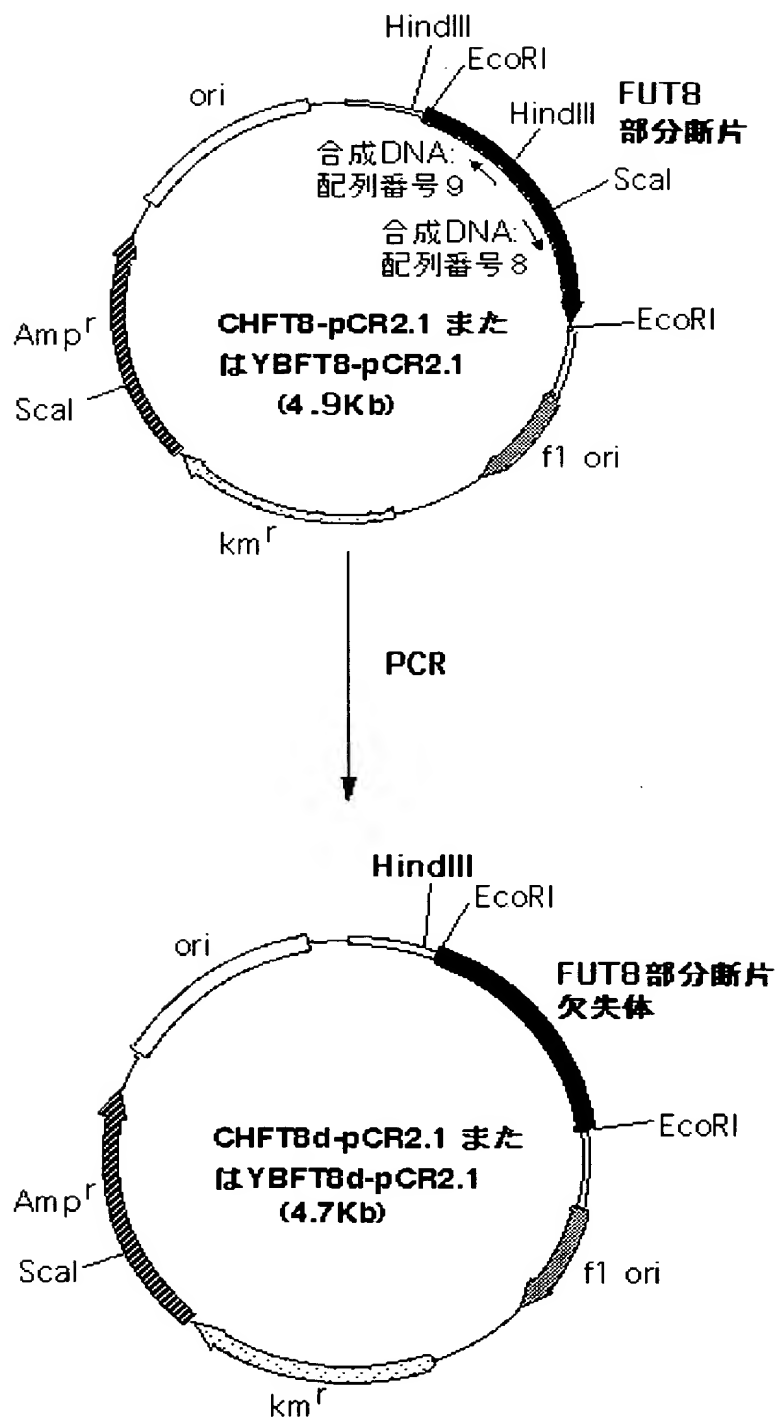
【図 12】



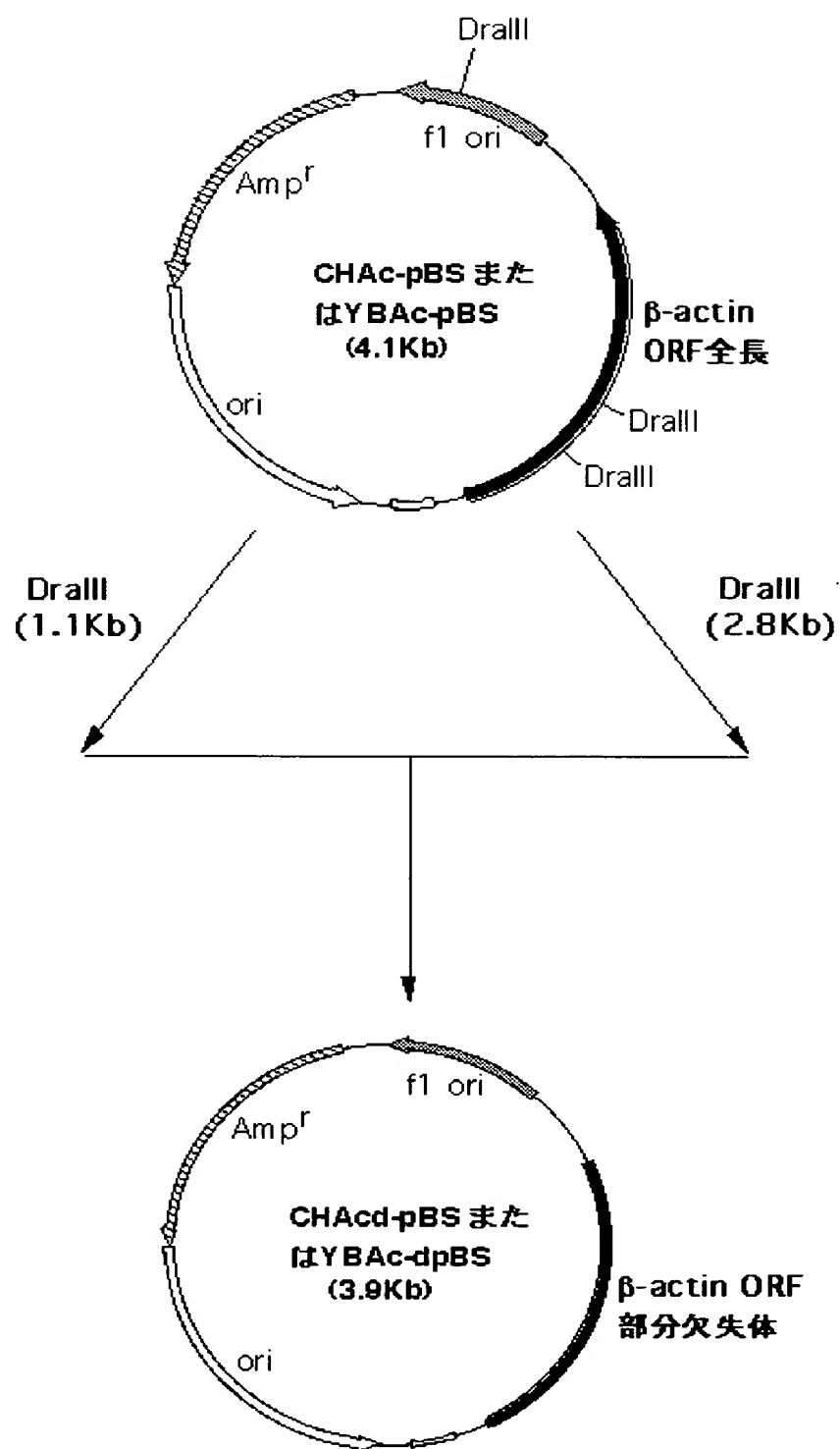
【図 13】



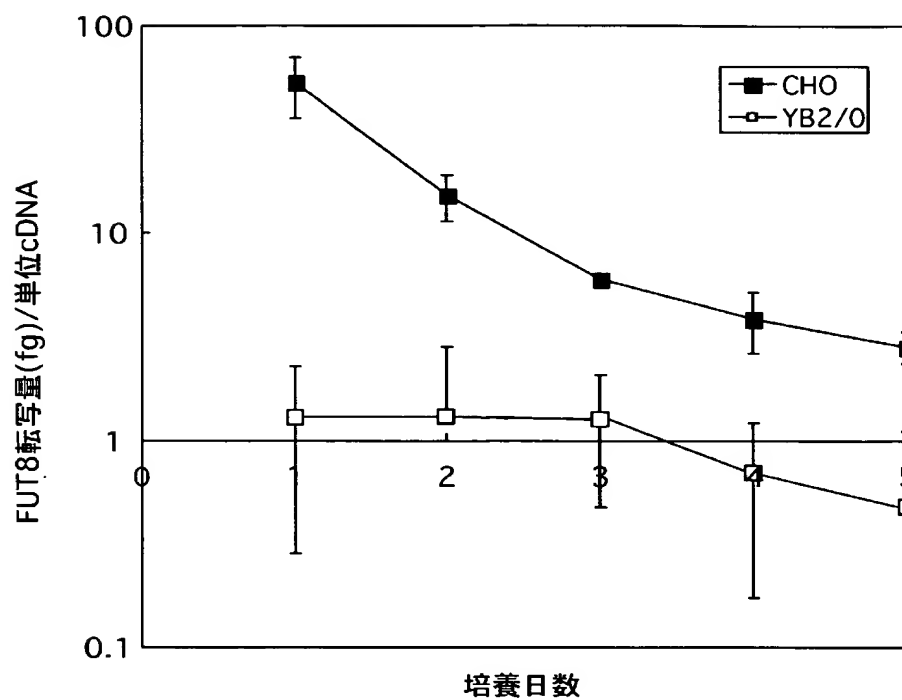
【図 14】



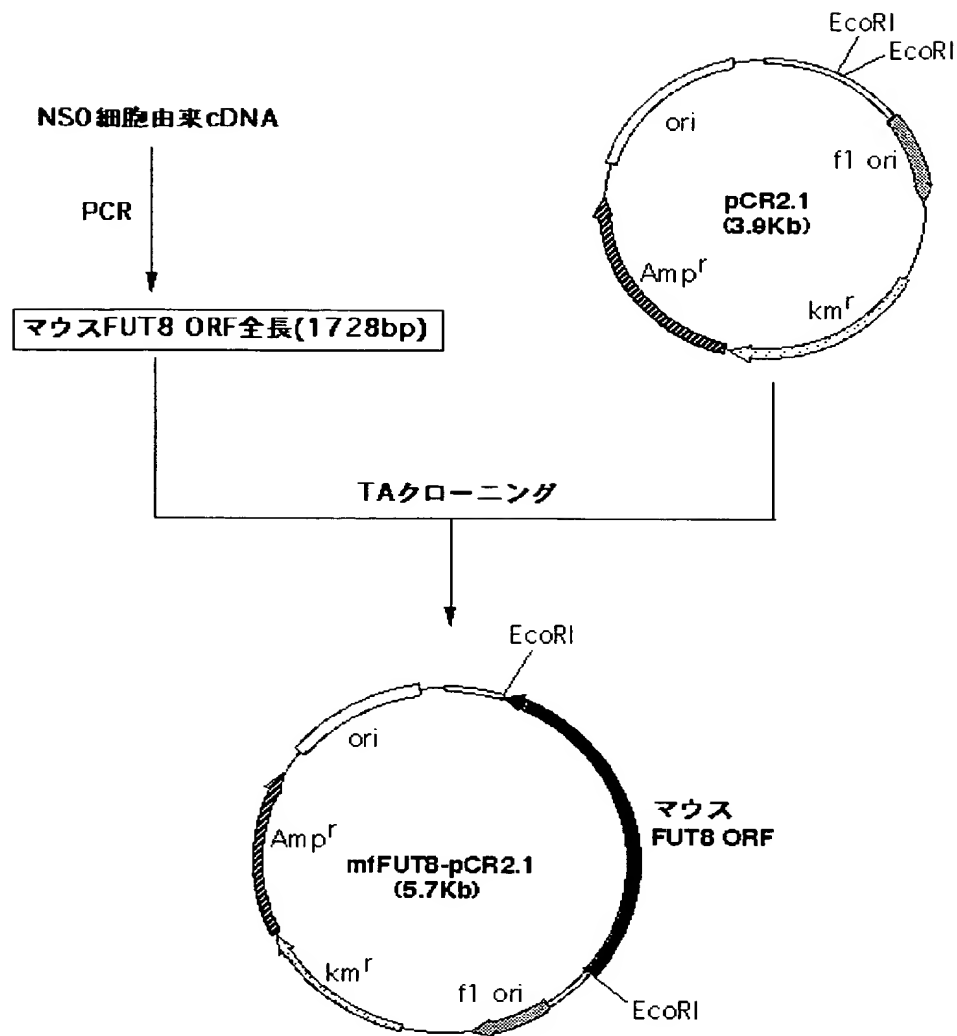
【図15】



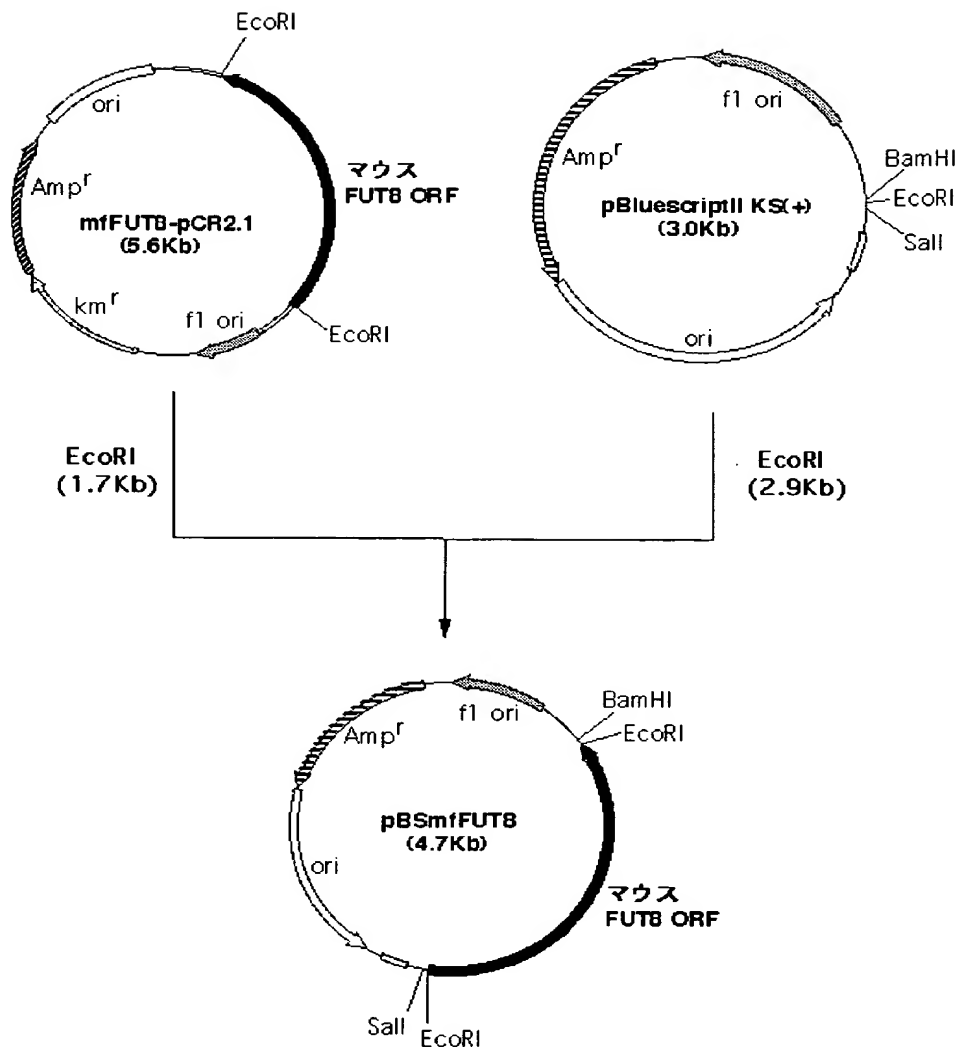
【図 16】



【図 17】

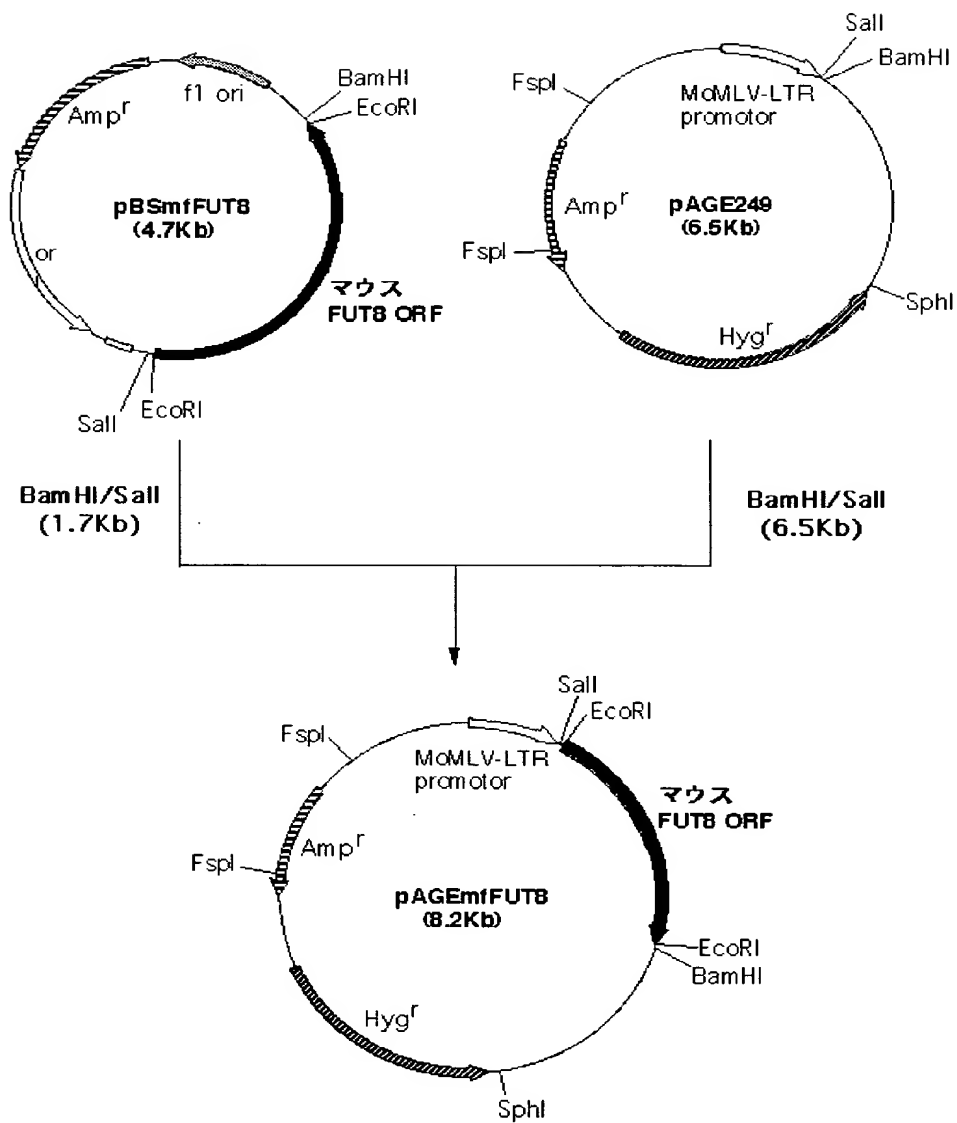


【図 18】

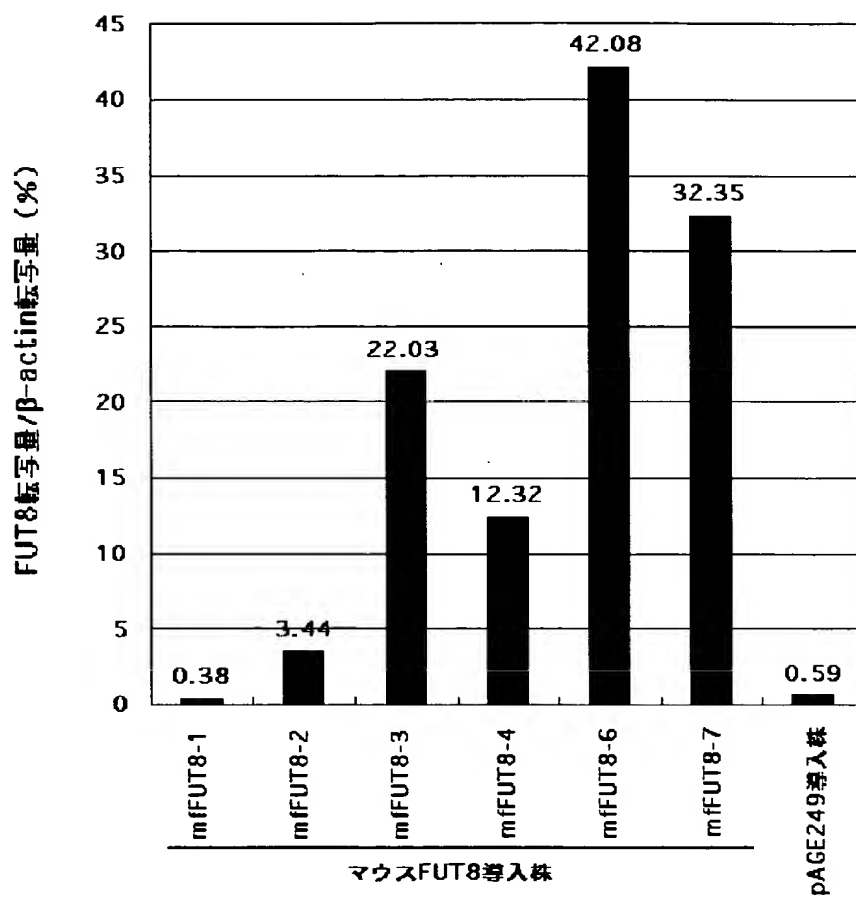




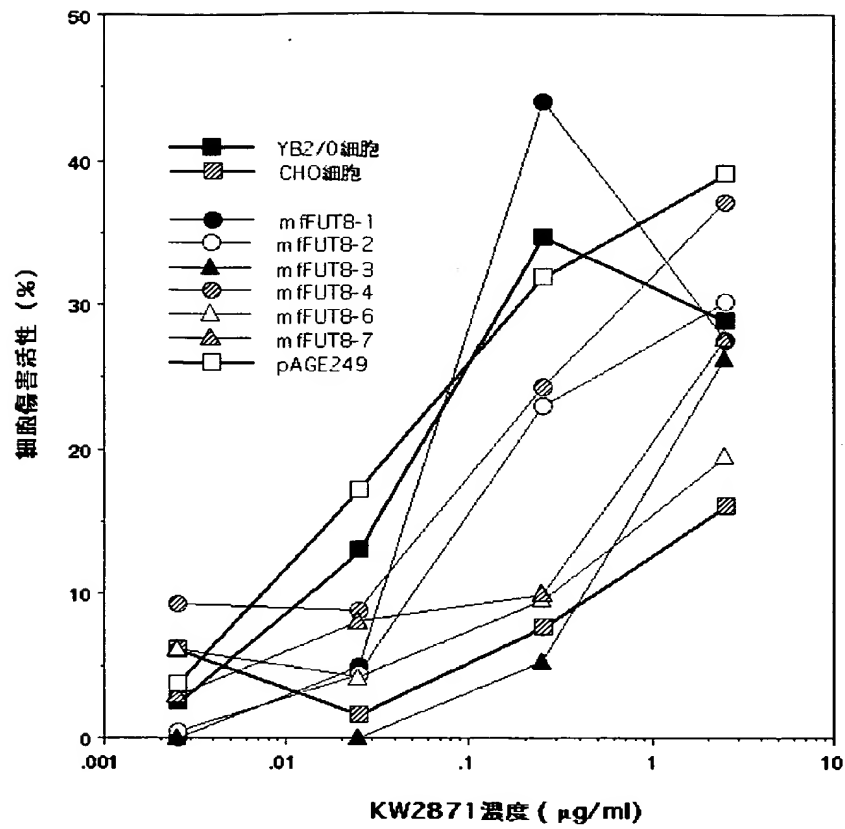
【図 19】



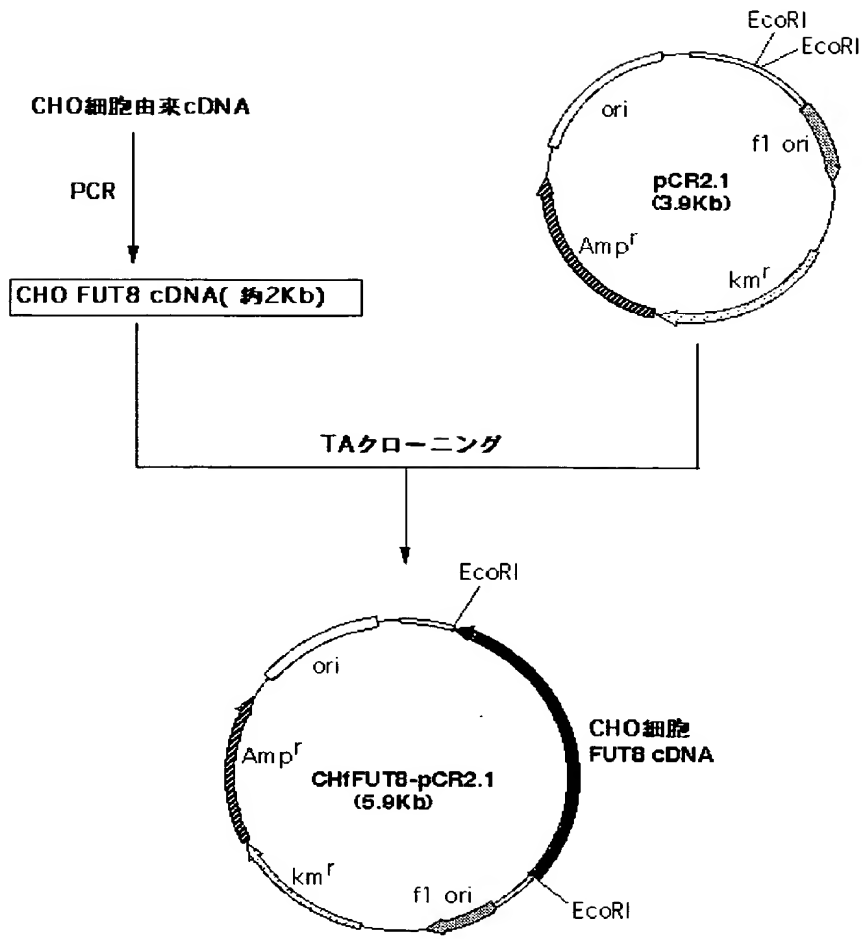
【図 20】



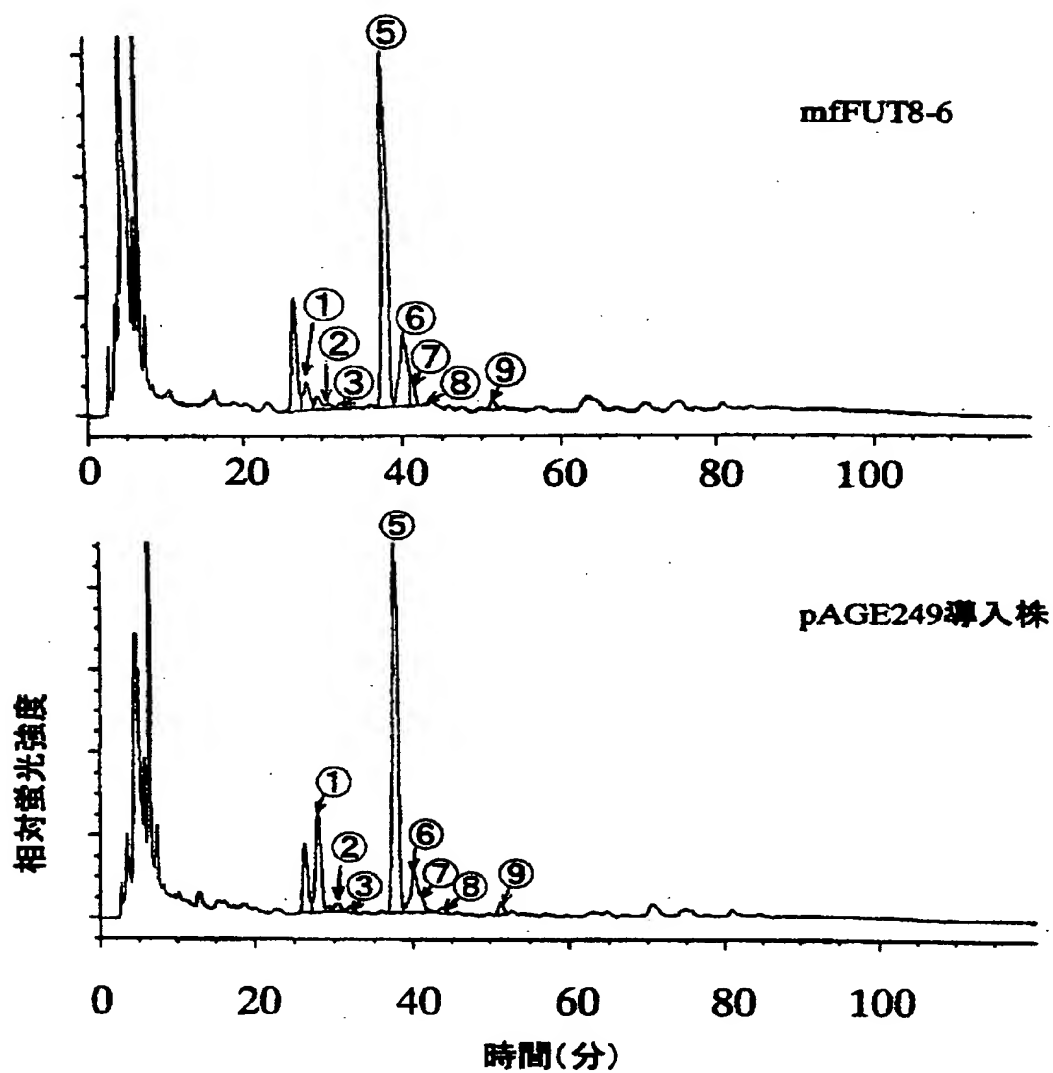
【図 21】



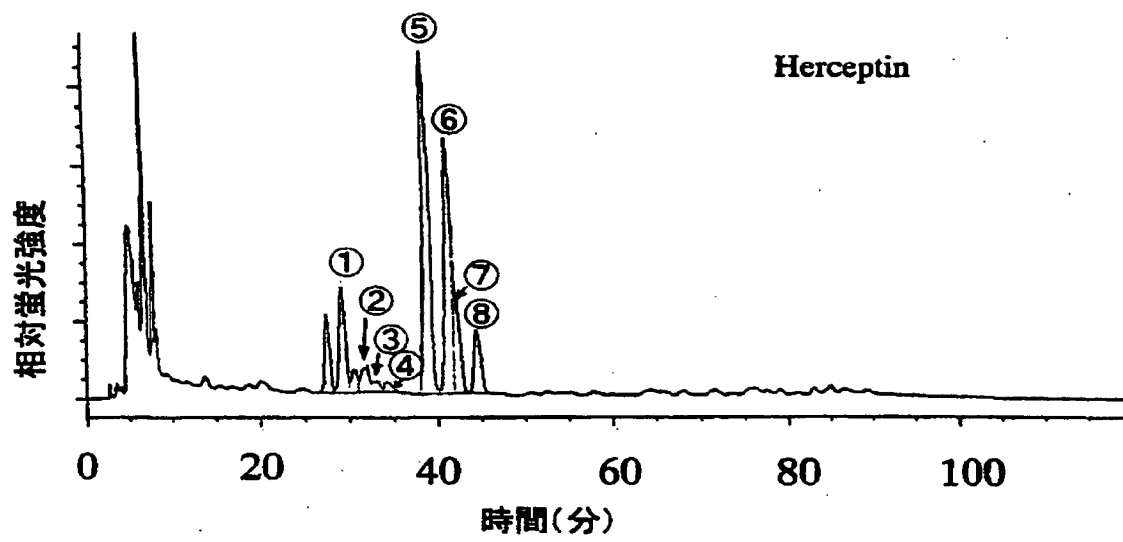
【図 22】



【図 23】



【図 24】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 糖タンパク質の糖鎖構造を制御できる、糖タンパク質生産用の宿主細胞として有用な細胞、特に、エフェクター機能が制御された免疫機能分子を生産することが可能な細胞、該細胞を用いた免疫機能分子の製造方法、免疫機能分子、ならびにその用途を提供すること。

【解決手段】 糖タンパク質の糖鎖の修飾に係わる酵素の活性が人為的手法により制御された細胞、それを用いた免疫機能分子の製造方法、免疫機能分子、それらの用途。

【選択図】 なし。

特願 2 0 0 0 - 3 0 8 5 2 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 1 0 2 9 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 6 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号

氏 名

協和醗酵工業株式会社



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**